UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CLARA MARIA GONÇALVES DE FARIA

Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em Terapia
Fotodinâmica

São Carlos
2017

CLARA MARIA GONÇALVES DE FARIA

Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em Terapia
Fotodinâmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Faria, Clara Maria Gonçalves de
Distribuições de limiar de dose e suas causas e
consequências em Terapia Fotodinâmica / Clara Maria
Gonçalves de Faria; orientador Vanderlei Salvador
Bagnato - versão corrigida -- São Carlos, 2017.
86 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2017.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Distribuição de limiar
de dose. 3. In vitro. I. Bagnato, Vanderlei Salvador
, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e a de todas as pessoas ao meu redor que dão sentido a ela.

A meus pais, que doaram parte da vida deles para que eu tivesse todas as oportunidades de ser feliz. Sintam que o sacrifício de vocês valeu a pena, pois eu sou. Esse trabalho é tanto meu quanto de vocês.

Ao meu irmão, a pessoa mais doce que eu conheço. Crescer com você foi um presente e fico feliz de te ter para dividir conquistas e dificuldades.

À minha família, e por família incluo todas as pessoas que são sinônimo de carinho e cuidado, independente do parentesco de sangue. Já nasci com a sorte de pertencer a uma família grande, que nunca falhou em estar ao meu lado, mas sorte maior foi aumentar essa lista ao longo do tempo. Vocês, que me acolheram em lugares onde eu não conhecia ninguém, me trouxeram até aqui por dividirem comigo o peso das dificuldades e me darem motivação e alegria para buscar os meus sonhos.

Ao Gabriel, seu incentivo e apoio foram fundamentais, sempre vou ser grata a você.

À profa. Andrea Antunes, minha primeira orientadora. Não existe espaço suficiente aqui para escrever tudo o que aprendi com você. Você foi fundamental para que eu escolhesse essa carreira, mesmo nunca tendo escondido de mim as dificuldades que viriam com essa escolha. Sou ainda mais agradecida por todo o carinho que você tem por mim.

Aos amigos do grupo de Óptica, Clóvis, Sebastião, Lili, Didi, sempre dispostos a me ajudar e que deram apoio fundamental para a execução desse trabalho. Agradeço especialmente aos colegas do laboratório de células, Bruno, meu professor de cultivo celular, Carolina e Ila, pela ajuda do dia a dia.

Ao grupo de Nanotecnologia e Nanotoxicologia, que sempre esteve de portas abertas para ajudar nesse trabalho.

A Natália Inada, que foi minha co-orientadora não oficial. Agradeço por ter me tratado como sua própria aluna, me ajudando em tudo que eu precisei, sempre com muito carinho. Esse trabalho não teria acontecido sem você.

Ao prof. Vanderlei Bagnato, pela oportunidade de ser sua aluna. Com ela, vieram a dedicação, o apoio e os ensinamentos que seus alunos sempre recebem, mesmo em meio a suas viagens e compromissos. Eu te agradeço por me inspirar e motivar continuamente, me lembrando de que nosso objetivo deve ser contribuir para melhorar a vida em sociedade.

Aos agências CAPES e FAPESP (processos 2009/54035-4 e 2015/06579-6) pelas bolsas de mestrado e apoio financeiro para realização desse trabalho.

RESUMO

FARIA, C. M. G. **Distribuições de limiar de dose e suas causas e consequências em Terapia Fotodinâmica**. 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O princípio de terapia fotodinâmica (TFD) foi introduzido por volta de 1900 mas posteriormente investigado como candidato para tratamento de cancer na década de 1970. Desde então, existem diversos trabalhos a respeito do assunto *in vitro*, *in vivo* e em estudos clínicos e grandes avanços foram alcançados. Entretanto, alguns desafios ainda não foram superados, como a variabilidade dos resultados. Este trabalho consiste na investigação de suas causas, em que o principal objetivo é avançar o estado da arte em TFD. Para isso foi usado um modelo de distribuição de limiar de dose para avaliar resistência em TFD *in vitro*. As distribuições de limiar de dose são obtidas pela derivação a curva de dose resposta experimental. Elas são caracterizadas pela sua largura e pela dose que corresponde ao pico, que se relaciona a homogeneidade e resistência intrínseca da população, respectivamente. Na seção 1, é apresentada a avaliação e comparação de dados obtidos de resultados publicados na literatura e, na seção 2, de experimentos realizados pela autora em diferentes linhagens celulares. Da análise da primeira etapa, foi observado que a largura da distribuição é proporcional a dose do pico e foi possível investigar a dependência do resultado da TFD com a linhagem celular, dado um fotossensibilizador (FS). Foi interessante, também, notar que as distribuições de limiar de dose correspondem a curvas de atividade de marcadores celulares de apoptose, como função da dose de luz, para a maior parte das condições analisadas. Dos experimentos realizados pela autora, foi visto que as células normais são as mais resistentes ao dano, seguida das células de câncer resistentes e sua linhagem parental, e que sua resposta foi a mais homogênea. Essas observações foram corroboradas pelas imagens obtidas de microscopia de fluorescência para avaliação da captação de FS, que mostraram que as células tumorais acumulam mais FS que as outras. Portanto, foi mostrado o potencial de se aplicar distribuições de limiar de dose na análise de resultados de TFD *in vitro*, ela é uma poderosa ferramenta que fornece mais informações que as curvas de dose resposta padrão.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Distribuições de limiar de dose. *In vitro*.

ABSTRACT

FARIA, C. M. G. **Threshold dose distributions and its causes and consequences in photodynamic therapy**. 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The principle of photodynamic therapy (PDT) was introduced around 1900 but further investigated as a candidate to cancer treatment in the 1970's. Since then, there are several papers regarding the subject *in vitro*, *in vivo* and clinical trials and great advances were achieved. However, some challenges were not yet overcome, such as results variability. This work consists in the investigation of its causes, where the main goal is to advance the state of art of PDT. For that it is being used a threshold dose distribution model to evaluate cell resistance to PDT *in vitro*. The threshold distributions are obtained by differentiating the experimental dose response curve. They are characterized by its width and the dose that corresponds to the peak which relates to the homogeneity and intrinsic resistance of the population, respectively. In section 1, it is presented the evaluation and comparison of data obtained from published results in literature and, in section 2, of experiments performed by the author in different cell lines. From the analysis in the first part, it was observed that the width of the distribution is proportional to its dose of the peak and it was possible to investigate the dependence of the PDT result with the cell line, given a fixed photosensitizer (PS). It was also interesting to note that the threshold distribution corresponded to the activity curves for apoptotic cell markers as a function of light dose, for most of the conditions analyzed. From the experiments performed by the author, it was seen that the normal cell line was the most resistant one, followed by the resistant cancer cells and its parental cell line, and that its response was more homogeneous. Those findings were supported by the fluorescence microscopy images obtained to evaluate PS uptake, which shown that the tumor cells accumulated more PS than the other ones. Therefore, it was shown the potential of applying the threshold distribution to analyze PDT results *in vitro*, it is a powerful tool that provides more information than the standard dose response curves.

Keywords: Photodynamic Therapy. Threshold dose distributions. *In vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectro de absorção de componentes do tecido biológico.	16
Figura 2 - Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos principais fluoróforos.....	17
Figura 3 - Diagrama de Jablonski.	19
Figura 4 - Morte celular por TFD.	20
Figura 5 - Um monócito derivado de macrófago humano (verde) engloba corpos apoptóticos (vermelho).	21
Figura 6 - Processo de autofagia de células jovens (a) e senescentes (b).....	22
Figura 7 - Curvas de dose-resposta de um modelo ideal de tratamento (vermelho) e real (azul).	29
Figura 8 - Curva de dose resposta genérica $f(D)$ e respectiva distribuição de limiar de dose $g(D)$	30
Figura 9 - Distribuições de assimetria negativa (a), nula (b) e positiva (c).	31
Figura 10 - ΔD em função de D_p para os experimentos mostrados na Tabela 1.	38
Figura 11 - D_p .absorção (a) e ΔD .absorção (b) como função da concentração de Photofrin®.	39
Figura 12 - D_p .absorção e ΔD .absorção como funções da concentração de ICV.	40
Figura 13 - Curvas de distribuição de limiar de dose e marcadores de apoptose para os FS (a) Photofrin, (b) ALA, (c) Hipericina, (d) ALPcS ₄ e (e) Fospeg.	42
Figura 14 - Deslocamento das distribuições de limiar de dose devido a aplicação de sucessivas sessões de TFD.	45
Figura 15 - Esquema simplificado do funcionamento de um microscópio confocal.	48
Figura 16 - Imagem da fonte de luz usada nos experimentos, a Biotable® 630 nm. À direita, uma placa sendo iluminada.....	50
Figura 17 - Imagem da interface do software Zen®, na função "Histo", que fornece a intensidade média de um canal de fluorescência.....	52
Figura 18 - Morfologia das células (a) HepaRG, (b) HepG2 e (c) HepG2-R.....	56
Figura 19 - Imagens pós-TFD das linhagens HepG2 (esquerda) e HepG2-R (direita)..	58
Figura 20 - Medidas de absorbância (superior) e fluorescência (inferior) de soluções de Photogem® em DMEM.	59
Figura 21 - Esquema ilustrativo da disposição dos poços utilizados (em tons de bege) na placa de 96 poços.	60
Figura 22- Microscopia Confocal das células (a) HepaRG, (b) HepG2 e (c) HepG2-R.	62
Figura 23 - Microscopia Confocal das células (a) HepaRG, (b) HepG2 e (c) HepG2-R..	63

Figura 24 - Curvas de dose resposta (esquerda) e suas respectivas distribuições de limiar de dose (direita) para as linhagens HepaRG, HepG2 e HepG-R.....	65
Figura 25 - Coeficiente de assimetria de Pearson (a) e razão (população com $D_{th} < D_p$ /população total) para as linhagens utilizadas.....	66
Figura 26 - Gráfico de D_p em função do inverso da concentração para as células de fígado.....	67
Figura 27 - Razão $\Delta D/D_p$ em função da concentração de FS.....	68
Figura 28 - Distribuições de limiar de dose das células de fígado, separadas por concentração de Photogem®.....	69
Figura 29 - Distribuições de limiar de dose para células RIF e seu clone resistente Cl8.	70

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Considerações gerais	15
2.1	Propriedades da luz e sua interação com a matéria biológica.....	15
2.2	Terapia Fotodinâmica.....	17
2.3	Conceito de distribuição de limiar de dose.....	28
3	Objetivos	33
4	Análise de curvas de $g(D_{th})$ para dados existentes na literatura.....	35
4.1	Materiais e Métodos	35
4.2	Resultados e Discussões.....	37
5	Experimentos de estudo da $g(D_{th})$	43
5.1	Introdução.....	43
5.2	Materiais e Métodos	48
5.3	Resultados e Discussões.....	55
6	Conclusões.....	73
	Referências.....	75

1 Introdução

Com incidência mundial de 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes em 2012, o câncer é um problema de saúde pública e uma das principais causas de morte na população, especialmente em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. No Brasil, a estimativa para 2016-2017 é de 600 mil casos novos da doença. (1)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa aos tratamentos convencionais de cirurgia, quimioterapia e radioterapia que oferece as vantagens de ser comparativamente pouco invasiva, de menor custo, permite aplicações sucessivas sem limitação total de dose e resulta em melhores resultados estéticos. (2) No entanto, existem desafios a serem superados de forma a tornar a TFD uma terapia padrão para tratamento de câncer, amplamente disponível em clínicas e hospitais. Um desses desafios é entender a variabilidade de resultados, Como a técnica depende da combinação de três componentes (droga, luz e oxigênio), distribuições insuficientes de algum deles levam a um comprometimento do resultado. Além disso, as células de uma população, mesmo que do mesmo tecido, naturalmente apresentam tolerâncias distintas A combinação desses fatores resulta em variabilidade de resultados clínicos e pré-clínicos, que é uma das limitações para a aceitação da TFD. Além de procurar responder questões de variabilidade, é preciso desenvolver formas que permitam comparar quantidades de modo a termos indicativos da melhor combinação de célula/fotossensibilizador/luz que devem ser usados.

A distribuição de limiar de dose de luz, obtida a partir de experimentos *in vitro*, é uma ferramenta que pode auxiliar no entendimento da resposta celular à terapia fotodinâmica. Por ela, pode-se obter parâmetros de resistência e heterogeneidade da resposta da população e obter condições ótimas de operação. A análise dessas curvas em TFD foi proposta anteriormente por Sabino et al., em um trabalho piloto. (3)

Nesse trabalho, foi aprofundado o estudo das distribuições de limiar de dose, obtidas de diversas condições de TFD (tipo celular, droga, parâmetros de iluminação). Na primeira parte do trabalho, essas curvas foram calculadas a partir de trabalhos da literatura e a análise das mesmas resultou em importantes observações. (4) Posteriormente, realizamos experimentos com diferentes linhagens hepáticas para obter as respectivas distribuições de limiar de dose.

2 Considerações gerais

2.1 Propriedades da luz e sua interação com a matéria biológica

A interação a luz com a matéria biológica, seja com células individuais ou tecidos, ocorre majoritariamente a nível molecular e resulta em uma cadeia de reações. Essas interações podem induzir efeitos químicos, físicos, mecânicos e térmicos, assim como uma combinação destes, e formam a base para o uso da luz em aplicações médicas para diagnóstico, tratamento e outros procedimentos médicos.

Os processos induzidos por luz no tecido biológico são, de forma simplificada, iniciados pela absorção linear de fótons, acontece por diversos componentes intra e extracelulares. No entanto, sob determinadas circunstâncias, como pulsos curtos de alta intensidade, a luz também induz processos ópticos não lineares, como geração de segundo harmônico e absorção de dois fótons com diversas consequências interessantes para diagnóstico e terapias. (5-7)

Em tecidos, considerando meios túrbidos, o espalhamento é o tipo predominante de interação da luz e contribui significativamente para sua atenuação em uma vasta região de comprimentos de onda. O espalhamento inelástico tem pequena contribuição para esse processo, o processo principal é o espalhamento elástico, ou Rayleigh, em que a energia da luz não é alterada. Esse último depende dos parâmetros: tamanho dos centros espalhadores (células ou organelas), a diferença entre índices de refração entre o centro espalhador e o meio, e o comprimento de onda da luz. A dependência com o último parâmetro é da ordem de λ^4 . Aliados ao espalhamento tem-se a absorção bastante intensa no visível. Na Figura 1 é mostrado esse comportamento pelos espectros dos coeficientes de extinção de alguns dos principais componentes absorvedores dos tecidos. A penetração da luz é determinada pelo espalhamento e absorção, altas frequências são principalmente barradas pelo espalhamento e o limite superior (em termos de comprimentos de onda) é dado pela absorção da água e das bandas vibracionais CH e OH, na região de λ maiores que 950 nm. (5) Por isso, a região de maior penetração, aproximadamente 650 a 900 nm, compreende é denominada janela óptica.

Figura 1 - Espectro de extinção de componentes do tecido biológico: oxihemoglobina (HbO_2), hemoglobina (Hb), água.
Fonte: Adaptada de KOBAYASHI et al. (8)

Autofluorescência

As células exibem uma variedade de processos fotoquímicos e fotofísicos após a absorção de luz. Para algumas moléculas e constituintes celulares, um desses processos é a fluorescência, que acontece após a excitação direta por um fóton ou indireta, pela transferência de energia para outro componente, de forma não radiativa. (9) O tempo de vida do estado singleto excitado é usualmente da ordem de 1-10 ns, a molécula tende, então, a emitir um fóton que possui energia igual a diferença entre o estado singleto e o estado de menor energia para o qual a molécula decai, que pode ser o estado fundamental, por exemplo. (5) A fluorescência de componentes celulares é denominada autofluorescência e, as moléculas emissoras são denominadas fluoróforos. Os principais deles são NADH, flavinas, aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina, por exemplo), porfirinas e lipopigmentos (como ceróides e lipofuscinas). (10) Na figura 2 são mostrados os espectros de absorção e fluorescência de alguns fluoróforos citados. A fluorescência é normalmente quantitativa e serve para diagnósticos através de alterações nas quantidades de fluoróforos nos tecidos.

Figura 2 – Espectros de absorção (esquerda) e emissão (direita) dos principais fluoróforos. Os eixos y estão apresentados em escala relativa.

Fonte: Adaptada de ALFANO et al. (11)

2.2 Terapia Fotodinâmica

O conceito de terapia fotodinâmica (TFD) existe desde 1900, o primeiro registro que se tem é de um estudante de medicina, Orcar Raab, em Munique, Alemanha. Ele observou que microrganismos que tinham sido incubados com certos pigmentos morriam se expostos a luz, enquanto, no escuro, não era notado dano algum. (12) O termo ação fotodinâmica surgiu quando foi descoberto subsequentemente que o oxigênio também era necessário para esse efeito tóxico. (13) Todavia, devido a motivos históricos como as duas guerras mundiais e o grande crescimento da indústria farmacêutica, somente a partir da década de 1970 que a TFD e suas aplicações médicas passaram a ser amplamente estudadas. Dentre elas, se destacam o tratamento de câncer em tumores de pele, cabeça e pescoço, trato gastrointestinal, próstata, bexiga, útero, colangiocarcinoma, outras condições como esôfago de Barrett e queratose actínica, e as aplicações antimicrobianas e antifúngicas, como a onicomicose. (14-15)

A TFD se baseia na excitação de uma molécula fotosensível pela absorção de energia eletromagnética e a transferência dessa energia para moléculas de oxigênio ou orgânicas que se tornam altamente reativas, causando danos às células. O processo completo, que envolve diversas etapas, mecanismos e possíveis rotas de ação, é descrito a seguir.

Mecanismos fotoquímicos

A droga utilizada na TFD é denominada fotossensibilizador (FS). A maior parte deles, em seu estado fundamental, possuem dois elétrons de spins opostos no seu orbital molecular mais favorável. A absorção de um fóton de comprimento de onda adequado leva a transferência

de um elétron a um orbital mais energético, que, por sua vez, não é estável, o que resulta na emissão dessa energia absorvida sob a forma de calor (conversão interna), fluorescência (emissão de um fóton) ou transferência não radiativa entre moléculas. A fluorescência é uma característica interessante desse processo, pois permite a observação da distribuição do fotossensibilizador por técnicas de detecção óptica. A microscopia confocal, por exemplo, é uma ferramenta muito utilizada nos estudos de TFD, possibilitando a observação da captação e localização de fotossensibilizadores em imagens de alta resolução de estruturas celulares.

O cruzamento intersistema leva os FS a um estado tripleto com spins paralelos. O decaimento desse estado para o fundamental pode acontecer pela emissão de um fóton (fosforescência), por vias não radiativas, ou pela transferência de energia a uma molécula do meio. Uma das formas dessa transferência é a recepção ou doação de um átomo de hidrogênio ou elétron por uma molécula orgânica que faz parte do microambiente celular formando um radical, caracterizando uma reação Tipo I. Se a transferência acontece pela excitação de uma molécula de oxigênio molecular (O_2), que é tripleto em seu estado fundamental, a reação é classificada como Tipo II. Essas moléculas provenientes reações das reações Tipo I e II geram radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez forma radicais hidroxila ($^{\bullet}OH$), e estas causam danos a moléculas nas membranas, organelas e outros componentes das células. (5, 13-14) Na Figura 3, o diagrama de Jablonski, são ilustrados esses processos.

Figura 3 - Diagrama de Jablonski.

Fonte: Adaptada de ABRAHAMSE et al. (13)

O tempo de vida do oxigênio singlete é muito curto ($\sim 10\text{--}320$ ns), por isso, sua difusão e, consequentemente, seu local de dano se limitam a aproximadamente 10-55 nm do local onde é produzido nas células. (16) Por isso, é muito provável que a geração de radicais tóxicos e dano aconteça muito próxima da localização do FS na célula. (17) Geralmente os fotossensibilizadores não possuem alta seletividade em relação a uma organela, eles se encontram em múltiplos sítios, no entanto, para algumas moléculas se observa uma localização preferencial. (18) Se acredita que essa localização tem grande impacto no tipo de morte induzida por TFD, que pode ser necrose, apoptose ou autofagia. (13) Na figura 4 são ilustrados esses tipos de morte e a seguir são discutidos em mais detalhes os mecanismos dessas vias e seu papel na TFD.

Figura 4 - Morte celular por TFD.

Fonte: Adaptada de AGOSTINIS et al. (14); ABRAHAMSE et al. (13)

Tipos de morte celular

A necrose é um processo de degeneração rápido e não controlado, é caracterizada por inchaço citoplasmático, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática, levando ao extravasamento do conteúdo celular e consequente inflamação. (19) Esse processo é predominantemente mediado por atividade proteolítica, mas as proteases específicas e seus substratos ainda não são bem definidos. (20)

A apoptose é uma morte programada composta por um processo complexo, envolvendo diversas etapas e vias celulares, controlado por diversas proteínas, que está geneticamente

codificada em todas as células. (21) Quando a apoptose é iniciada, vias de sinalização da superfície da célula ou do local de dano convergem em um número restrito de mecanismos centrais que resultam na fase final de execução desse processo, na qual enzimas hidrolíticas, incluindo proteases e nucleases, são ativadas e características morfológicas se tornam evidentes. (22-23) A apoptose pode ser iniciada pela ativação de receptores de morte ou pela liberação de citocromo *c* pela mitocôndria. (24) Esses eventos resultam na ativação de caspases conhecidas como caspases iniciadoras (caspase 3, 6 e 7), responsáveis pela clivagem de substratos celulares que geram mudanças bioquímicas e morfológicas características de morte. (25–27) Dentre eles, se destacam a clivagem de laminas nucleares, condensação da cromatina e contração do núcleo, fragmentação do DNA e, no citoplasma, desestruturação do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos. (28) Por fim, o reconhecimento, captação e degeneração dos corpos apoptóticos da célula morta acontece rapidamente por fagócitos, evitando o extravasamento do conteúdo celular no local. (29) Na Figura 5 é mostrado o processo de fagocitose por um macrófago de uma célula morta. Sabe-se que a resistência do câncer a apoptose é um fator determinante no desenvolvimento tumoral, portanto, a modulação das vias de sinalização desse processo podem influenciar diretamente o resultado de uma terapia antitumoral. (30)

Figura 5 – Um monócito derivado de macrófago humano (verde) engloba corpos apoptóticos (vermelho).
Fonte: SAVILL et al. (28)

A autofagia é um mecanismo celular catabólico que atua na manutenção do equilíbrio entre síntese, degradação e reciclagem de produtos celulares. Existem diversos processos autofágicos, todos envolvendo degradação de organelas celulares e proteínas por lisossomos. (31) O mecanismo mais conhecido acontece da seguinte forma: o autofagossomo, estrutura

de membrana dupla, engloba a região alvo criando uma vesícula que separa aquele conteúdo do resto do citoplasma. O autofagosomo então se funde a um lisossomo e seu conteúdo é degradado por hidrolases lisossomais. (32) A autofagia, além de facilitar a degradação de organelas, proteínas e microrganismos indesejados, permite à célula a realocação de nutrientes de processos desnecessários em situações de stress. (33) Na figura 6 são mostradas imagens de células em processo de autofagia e detalhes dos vacúolos autofágicos.

Figura 6 – Processo de autofagia de células jovens (a) e senescentes (b). (c,d e) são detalhes dos autofagosomos das células senescentes, (c) mostra um vacúolo de membrana dupla enquanto (d,e), de membrana simples. N: núcleo, N*:núcleo deformado, com menos heterocromatina, k: estrutura de citoqueratina envolvendo o núcleo e os autofagosomos, av: autofagosomos.

Fonte: Adaptada de GOSSELIN et al. (34)

Mecanismos de citotoxicidade mediados por TFD

Na necrose induzida por TFD, com o extravasamento do conteúdo celular, foi observada a liberação de diversas moléculas de sinalização, como os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), que iniciam ou reforçam a resposta imune em processos inflamatórios não infecciosos, proteínas de choque térmico (HSP), que desempenham uma função pró-sobrevivência em TFD, o grupo de proteínas HMGB1, interleucinas IL-1 α e IL-6, e trifosfato de adenosina (ATP). (14)

A necrose é a via de morte a altas concentrações de FS e doses de luz pois o dano causado é muito maior que o limiar, ou, em outras palavras, a tolerância da célula. (18) Para condições abaixo disso, o dano causado pode levar a apoptose ou autofagia ou então os mecanismos de reparo são suficientes para impedir a morte celular. Nagata et al. observaram que doses que causavam menos de 70% de citotoxicidade induziam preferencialmente apoptose e necrose era o principal mecanismo a energias que causavam 90% de morte. (35)

A necrose induzida por TFD também pode ocorrer devido a outros fatores, como a influência da localização do FS, privação de glicose e genótipo celular. (36–39) Essa via de morte induzida por TFD, no entanto, é pouco estudada em comparação a apoptose.

Frequentemente, o primeiro evento observado nesse processo mediado por TFD é a dissipação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e a liberação do citocromo *c*, que acontece devido, mas não somente, a mudança em $\Delta\Psi_m$. (40) Ambos foram observados simultaneamente, imediatamente após a TFD, por Kessel et al. em células leucêmicas P388. (41) Chaloupka et al. observaram a redução de $\Delta\Psi_m$ após a TFD com hipericina em fibroblastos NIH 3T3. (41-42) Em outros casos, foi observada a liberação do citocromo *c* sem que houvesse modificações do potencial de membrana. (43) No estudo de Chiu e Oleinick, foi observado que a relação entre os dois efeitos é dose-dependente, a altas doses ambos eram observados enquanto a baixas energias a liberação do citocromo *c* era observada sem reduções de $\Delta\Psi_m$. (44) Além dessa proteína, existem outras que são liberadas do espaço intermembrana da mitocôndria durante a apoptose, como o fator indutor de apoptose (AIF), proteína associada a indução de apoptose independente de caspases. (45)

Acredita-se que o citocromo *c*, quando liberado no citosol, resulta na clivagem e ativação da caspase-9, que, por sua vez, ativa a caspase-3, uma das caspases iniciadoras. (40) A ativação da caspase-9 foi observada na TFD com os FS Verteporfirina e Pc4. (46-47) A ativação da caspase-3 seguida da TFD foi observada em diversos estudos. (48–54) Também já foi mostrada a ativação das caspases 2,6,7 e 8 pelo dano da TFD com os FS verteporfirina e rosa bengala (55-56), no entanto, acredita-se que as vias mediadas por essas tem maior impacto quando as mediadas pelo citocromo *c* e caspases 3 e 9 são inibidas.

A família de proteínas Bcl-2 desempenha um papel importante na morte por apoptose. Ela é composta por grupos pró-apoptose, como Bax, Bok, Bfm, Bcl-xS, que promovem a morte celular, e anti-apoptóticos, que regulam vias de sobrevivência, entre estes se destacam Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl e A1. (57) Foi proposto que a maior influência na propensão de uma célula entrar em apoptose como resposta a um estímulo externo é a razão entre as concentrações Bax/Bcl-2. (58) Assim, elevadas quantidades de Bax promovem a morte mesmo na presença da Bcl-2. Estudos em TFD mostraram que muitas vezes a super expressão de uma dessas proteínas é acompanhada de altas concentrações da outra. (18, 40) Os resultados não são conclusivos sobre seus efeitos, é necessária uma investigação mais aprofundada no papel desses grupos na resposta à TFD.

Em geral, células de mamíferos utilizam a autofagia como mecanismo de defesa contra danos causados por espécies reativas de oxigênio, eliminando organelas alteradas. Dependendo do tipo de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e extensão do dano oxidativo, a TFD pode estimular essa via (59), que pode atuar a favor da morte ou sobrevivência celular. (60) A autofagia está relacionada à apoptose induzida por TFD, mas esses dois processos podem ocorrer independentes um do outro, a taxas deles dependem do tipo celular, FS e dose de luz entregue. (61) No estudo de Kessel e Arroyo foi observada apoptose seguida de autofagia em células de leucemia L1210, além do aumento das taxas de morte em baixas doses de luz quando a autofagia foi inibida. (62)

O dano da TFD também pode ocorrer diretamente a organelas relacionadas a autofagia, como lisossomos e endossomos e seu resultado depende do fotossensibilizador usado. Se o conteúdo dessas organelas é liberado não neutralizado, a morte celular é facilitada, entretanto, quando as enzimas são inativadas antes da ruptura da membrana, não é

observado dano à integridade da célula. (33) Esses efeitos dependem do tipo celular, em células no processo de apoptose a autofagia pode minimizar os danos oxidativos pela eliminação e reciclagem de organelas. (63) Em células em que os mecanismos de apoptose são deficientes, a autofagia tem o efeito de promover a morte, pela via de necrose. (33)

Fotossensibilizadores

A maior parte das moléculas de fotossensibilizadores tem como base de uma estrutura tetrapirrólica, similar à da protoporfirina que compõe a hemoglobina e também a várias outras biomoléculas. (13) Idealmente, um fotossensibilizador deve ter as seguintes características:

- forte absorção na região de 650-800 nm, para maior penetração da luz nos tecidos;
- bom rendimento quântico do estado tripleto, ou seja, produz quantidades significativas de EROs quando irradiado;
- baixa toxicidade no escuro e alta seletividade para tumores e baixa captação por tecidos saudáveis, para minimizar efeitos colaterais do tratamento; (64)

Também foi observado que os FS mais efetivos tendem a ter caráter hidrofóbico, que se difundem no tumor com facilidade e se localizam em membranas das células, como membrana mitocondrial ou retículo endoplasmático. (65) Centenas de compostos foram investigados para uso em TFD e vários deles possuem aprovação para uso clínico em diversos países, a seguir são listados alguns deles.

O 5-ácido aminolaevulinico (ALA) é um dos principais e mais usados compostos em TFD, precursor do fotossensibilizador protoporfirina IX. (66) Essa conversão só ocorre em células viáveis e o ALA e seus derivados são chamados de pró-droga. Suas aplicações são principalmente dermatológicas, no tratamento de câncer de pele e outras indicações. (67-68)

O derivado de hematoporfirina (HpD), uma mistura de porfirinas, foi o primeiro fotossensibilizador utilizado na era moderna da TFD, em 1970 pelo grupo de Dougherty. (69) Sua versão purificada, o Photofrin, foi o primeiro FS comercialmente disponível e é amplamente usado até hoje. (70) É administrado sistemicamente e não possui alta

seletividade tumoral, por isso observa-se fotosensibilização da pele após o tratamento com a droga. (14)

O grupo das clorinas incluem alguns FS de maior importância clínica, como o m-tetrahidroxifenilclorina (comercialmente disponíveis como Temoporfin ou Foscan) (71), derivado de benzoporfirina (Verteporfirina) (72), radaclorina e clorina(e6), derivada da clorofila e formulada como o FS Photodithazine (73) ou dissolvida em polivinilpirrolidona. (74) Outros FS classificados como clorinas estão sendo investigados, como o HPPH. (75)

As ftalocianinas são corantes sintéticos e são estudadas desde a década de 1980. Sua estrutura tem um átomo central como zinco, silício ou alumínio para aumentar a produção de oxigênio singleto. Tem forte absorção na região de 670 nm e caráter hidrofóbico, por isso são encapsulados por lipossomos. (70)

Outros corantes sintéticos incluem sais de fenotiazina, como azul de metileno e azul de toluidina, que são principalmente usados em aplicações antimicrobiológicas (76-77), e benzofenotiazina (EtNBS). (78) Na classe de corantes de xanteno, se destaca o FS Rosa bengala, que possui átomos pesados nos anéis, o que aumenta o rendimento quântico do estado tripleto da molécula. (13)

Os FS isolados de produtos naturais incluem hipericina, hipocrelinas A e B, riboflavina e curcumina, dentre outros. (42,79) Apresenta pico de absorção em 600 nm e afinidade intracelular pelo retículo endoplasmático, por isso é eficiente na ativação da resposta imunológica pós irradiação. (81)

Terapia Fotodinâmica in vivo e clínica

Em um organismo a resposta à TFD depende principalmente de três processos: morte tumoral direta, dano à vasculatura e ativação da resposta imune. Apesar de as três contribuições serem significativas, não é simples mensurar o peso de cada uma delas. A morte tumoral direta depende, além de todos os fatores mencionados anteriormente, da distribuição do FS e luz no tumor.

Assim como o tumor, células endoteliais também concentram fotossensibilizador devido a mecanismos de difusão e receptores similares Gomer et al. observaram que células de

endotélio bovino são mais sensíveis ao dano fotodinâmico que células de músculo liso ou fibroblastos usando porfirina de sódio. (82) No entanto, a sensibilidade não foi devida a diferenças no acúmulo de FS. O trabalho de West et al. investigou a resposta a TFD em células endoteliais de aorta bovina e de adenocarcinoma humano e mostrou que a linhagem vascular apresenta maior acúmulo de FS e maior sensibilidade ao dano. (83) O dano à vasculatura tumoral causa rompimento das paredes dos vasos e comprometimento da entrega de oxigênio e nutrientes para o tumor, além disso, há o extravasamento de componentes citotóxicos na região. (84) Esses acontecimentos favorecem a morte por necrose ou apoptose das células do local onde ocorreu o dano. A dose de luz influencia nessa resposta, a doses baixas, a reação pode ser menos intensa, resultando na apoptose como principal via de morte e morte tumoral por hipóxia, mas sem ativação do sistema imune. (69) Dependendo do contexto clínico da doença se deseja controlar o tipo da reação do sistema, a favor de apoptose ou necrose, o que pode ser feito pela entrega de luz.

O controle tumoral a longo prazo, após a TFD, depende, entre outros fatores, dos efeitos diretos da terapia na lesão e sua rede de vasos combinados a regulação da resposta imunológica. Foi mostrado que a inibição dessa resposta após o dano fotodinâmico reduziu os efeitos terapêuticos da técnica. (85–88) Assim como outras técnicas de tratamento anti-tumoral, como crioterapia, hipertermia e ablação por ultrassom), frequentemente a terapia fotodinâmica provoca inflamação aguda consequente do stress oxidativo observada como um edema localizado no lugar de tratamento. (89) A inflamação é uma medida de proteção a integridade do tecido do local, iniciada pelo organismo em reação ao dano, e seu objetivo é a remoção das células danificadas para reestabelecimento da homeostase e da função normal do tecido (90). Esse processo ativa a ação de linfócitos T, que agem no local do tumor e também no sistema linfático induzindo necrose e vias apoptóticas em células tumorais restantes, mesmo após a TFD. (69)

Dosimetria

Para garantir a entrega de energia e fotossensibilizador no tumor, e, assim, garantir bons resultados, a dosimetria é extensamente estudada em TFD. (91–98) Existem alguns parâmetros dosimétricos definidos nesses estudos que tem por objetivo relacionar a eficácia da TFD com seus parâmetros de tratamento. A dose de TFD, por exemplo, foi um conceito

introduzido em 1987 por Potter et al. e é definido pelo produto da concentração de FS e a dose de luz. No entanto, esse parâmetro falha em prever resultados de TFD pois não há equivalência direta entre dose de luz e concentração de FS. (99) Um dos problemas desse parâmetro é a falta de fatores que influenciam a resposta, como produção de oxigênio singlete, *photobleaching* e propriedades ópticas dos tecidos. (4) No intuito de corrigir essas lacunas, atualmente existem outras estratégias que se classificam em três tipos: dosimetria explícita, implícita e direta. A primeira se baseia na medida de vários fatores durante o tratamento, como degradação de FS, concentração de oxigênio e distribuição da luz no tecido, enquanto a abordagem indireta depende da medida da fluorescência ou *photobleaching* do FS. (100) A dosimetria direta, por sua vez, consiste na detecção da emissão do oxigênio singlete em 1270 nm. (101) Para todos os aspectos de dosimetria, o conceito de distribuição de dose estudado nesse trabalho tem potencial para aprofundar o entendimento da resposta a TFD, possibilitando o aperfeiçoamento desses modelos a partir do maior conhecimento das populações celulares frente ao dano fotodinâmico.

2.3 Conceito de distribuição de limiar de dose

Genericamente, uma relação entre um estímulo mensurável (como a dose de luz) e a resposta da matéria biológica é conhecida como relação de dose-resposta. (102) A morte é um tipo de resposta binária, o que significa que, sua ocorrência, para qualquer indivíduo, depende do nível de estímulo e é medida em escala binária: ocorre ou não. (103) Portanto, se todas as células de um tecido ou órgão fossem idênticas em todos os aspectos, haveria um único valor de limiar que seria capaz de induzir a morte de toda a população. No entanto, não é isso que se observa experimentalmente. Em estudos de citotoxicidade observa-se que nem todas as células sofrem o mesmo tipo de dano, o que demonstra que mesmo uma população celular derivada de uma mesma célula mãe, apresenta heterogeneidades em relação à morfologia e diferenciação. De modo que o limiar de dose não pode ser descrito como um valor constante, e sim como uma distribuição.

Seja D a dose de um estímulo, a distribuição de limiar de dose pode ser matematicamente expressa como $g(D)dD$, que representa a proporção de indivíduos com tolerâncias entre D e $D+dD$, onde dD é um intervalo infinitesimal de dose. Considerando que, dado um estímulo suficientemente alto, toda população responde, então tem-se que:

$$\int_0^{\infty} g(D)dD = 1 \quad (1)$$

Isso implica que $g(D)dD$ representa a probabilidade de que uma célula tenha limiar de dose entre D e $D+dD$. Dessa forma, a uma dose D_0 de exposição, todos os indivíduos que possuem limiar de dose menor ou igual a D_0 irão responder. A fração da população que representa esse grupo é dada por:

$$f(D_0) = \int_0^{D_0} g(D)dD \quad (2)$$

onde $f(D_0)$ é conhecida como distribuição cumulativa e pode ser interpretada como a probabilidade de um indivíduo da população, selecionado aleatoriamente, irá responder a dose D_0 . Resultados de experimentos de toxicidade mostram que a distribuição cumulativa observada é monotonamente não decrescente e apresenta comportamento sigmoide em relação a dose. Na Figura 7 são mostradas uma curva de dose-resposta genérica, que representa o que se é observado experimentalmente, e uma dose-resposta ideal (uma função degrau), que só seria observada caso toda a população possuísse o mesmo limiar de dose D . O valor D também é o limiar de dose para a maioria das células da população do modelo real. A variação em torno desse valor indica que existe um número de células com doses limiares inferiores e um número de células com doses limiares superiores a D .

Figura 7 - Curvas de dose-resposta de um modelo ideal de tratamento (vermelho) e real (azul).
Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, a distribuição de limiar de dose pode ser obtida pela inversão da equação (2), resultando em:

$$g(D_0) = \left. \frac{df}{dD} \right|_{D_0} . \quad (3)$$

As características principais de uma distribuição desse tipo são sua largura, que nesse estudo é medida à meia altura (ΔD), e a dose correspondente ao pico (D_p). ΔD pode ser interpretado como um parâmetro da heterogeneidade da população em relação a resposta ao estímulo e D_p é a moda da distribuição, ou seja, o limiar mais frequente entre os indivíduos, e, por isso, quantifica a resistência característica da população. Na figura anterior (Figura 7), D_p seria correspondente a D . Na figura 8 é mostrada uma curva de dose resposta hipotética e sua distribuição de limiar de dose.

Figura 8 - Curva de dose resposta genérica $f(D)$ e respectiva distribuição de limiar de dose $g(D)$.
Fonte: Elaborada pela autora.

A simetria da curva fornece informações importantes sobre a distribuição. Uma curva simétrica é aquela em que sua moda, média e mediana coincidem. Para avaliar esse parâmetro, será usado o coeficiente de assimetria de Pearson, calculado pelo software Origin®, que para uma amostra de n valores, é computado por:

$$A = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{x}}{\sigma} \right)^3 \quad (4)$$

onde $\bar{x}$ é a média e σ é o desvio padrão. A figura 9 mostra curvas de assimetria negativa (a), nula, ou seja, uma curva simétrica (b) e uma distribuição de assimetria positiva (c).

Figura 9 - Distribuições de assimetria negativa (a), nula (b) e positiva (c).
 Fonte: Adaptada de ELING. (104)

A distribuição $g(D_{th})$ é fundamental para poder-se comparar o comportamento de diferentes combinações de células, FS e luz na eficiência da TFD. A comparação de situações é fundamental para escolhas adequadas de tratamento.

3 Objetivos

Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é avançar no estado da arte do entendimento da ação da terapia fotodinâmica. Para isso, serão avaliadas diferentes condições de tratamento (com diferentes fotossensibilizadores e células) através das curvas de distribuição de limiar de dose. A largura da curva se relaciona à heterogeneidade da população de células e, o valor da dose que corresponde ao pico, à resistência. Através desses parâmetros, é possível comparar quantitativamente diferentes condições de TFD.

Objetivos específicos

- Obter curvas de distribuição de limiar de dose a partir de dados existentes e realizar uma comparação quantitativa dos diferentes estudos, mesmo em situações diversas;
- Comparar diferentes condições de tratamento a partir da verificação das distribuições de limiar de dose em culturas celulares para células sadias e neoplásicas de fígado;
- Aplicar um protocolo para indução de resistência nas células tumorais e investigar alterações na distribuições de limiar de dose devido a exposição sequencial;
- Investigar captação de FS e tipos de morte induzidas por TFD e sua relação com as distribuições de limiar de dose;

4 Análise de curvas de $g(D_{th})$ para dados existentes na literatura

4.1 Materiais e Métodos

A partir de trabalhos publicados de TFD *in vitro* em cultura de células (monocamada), pontos das curvas de dose resposta foram recuperados e ajustados de acordo com um modelo sigmoide que apresentou o melhor parâmetro de Chi-quadrado (102) usando o software Origin 9.0.0 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA). Foram excluídos os trabalhos que não apresentaram pontos suficientes para o ajuste (<3), que não exibiram a resposta para doses altas (com morte $> 80\%$) ou que não apresentaram um bom ajuste. Alguns estudos também foram excluídos por não ser possível recuperar com precisão os valores dos pontos (escala logarítmica combinada a baixa resolução dos gráficos, por exemplo).

Calculando a derivada das curvas de dose-resposta, foram obtidas as distribuições de limiar de dose correspondentes. Usando o software, também foram calculados os parâmetros de dose do pico (D_p) e dispersão (ΔD) usando a função “Peak Analyzer”. As referências e parâmetros são mostrados na Tabela 1. Essa análise foi publicada na revista “*Journal of Photochemistry & Photobiology*”, em setembro de 2016. (4)

Tabela 1 - Condições experimentais e parâmetros das distribuições de limiar de dose.

Referência	Linhagem celular	Fotosensibilizador/concentração/ tempo de incubação	Comprimento de onda	D_p (J/cm ²)	ΔD (J/cm ²)
(105)	RD	Photofrin®, 100 µg/ml	635 nm laser de diodo,	73,24	46,24
(106)	A431	Photofrin®, 2 µg/ml, 20h	630 nm LED, 2,33 mW/cm ²	0,90	0,66
(107)	R3327-AT	Photofrin®, 5 µg/ml, 1h	630 nm laser de Argônio, 15	2,64	1,92
		20 µg/ml	mW/cm ²	0,73	0,58
		100 µg/ml		0,10	0,12
(7)	Ypen-1	Photofrin® 25 µg/ml, 24h	514 nm, 0,2–1,12 µW	0,05	0,05
(108)	EMT-6	Photofrin-II, 25 µg/ml, 24h	590-640 nm, 4 mW/cm ²	1,30	0,86
	RIF			0,73	0,62
(109)	RIF	Photofrin-II, 25 µg/ml, 16h	Luz vermelha (comprimento	2,61	1,70
	RIF(resistente CI8)		de onda não especificado),	2,99	2,28
	RIF(resistente CI4)		0,35mW/cm ²	3,10	1,94
(110)	MLL	Photofrin®, 25 µg/ml, 18h	532 nm laser, 4,3 ± 0,2	0,01	0,05
		5 µg/ml	mW/cm ²	0,32	0,41
		1 µg/ml		1,91	2,44

(continua)

(continuação)

(111)	MLL	HPPH, 4h	650 nm laser de diodo, 11	17,29	11,01
		1,2 μ M	mW/cm ²	3,12	3,54
		3,6 μ M		0,61	1,21
		12 μ M		0,15	0,25
(106)	A431	ALA, 1 mM, 20h	630 nm LED, 2,33 mW/cm ²	0,79	0,64
(112)	HeLa	ALA, 0,18 mM, 18h	635 nm laser de diodo	24,94	26,90
(113)	RIF	ALA 1 mM, 1h	623-634 nm Lâmpadas	0,17	0,13
		5h	fluorescentes, 0,92 mW/cm ²	0,13	0,26
		PpIX, 17 mM (10 mg/mL 18h		0,24	0,22
	RIF8A (resistente)	ALA 1 mM (0,167 mg/mL), 5h		0,05	0,26
(114)	LM3	ALA – 0,6mM, 3h	514 nm laser, 0,03 W/cm ²	0,16	0,22
	Clon4			1,11	0,56
(115)	MDA-MB	ALA, 1 mM, 6h	405nm LED, 41 nW/cm ² a 9	0,14	0,31
			mW/cm ²		
	U87		634nm LED, 5,8 μ W/cm ² a 2,81,49		3,48
			mW/cm ²		
(116)	Hep2	Éteres de dihematoporfirina	514 nm	0,59	0,63
		Eosina-Y		0,78	1,29
		Derivado de hematoporfirina		0,86	0,91
(117)	CHO	HPD, 10 mg/ml, 24h	627 nm Laser, 10 mW/cm ²	0,51	0,67
			20 mW/cm ²	0,92	0,83
			50 mW/cm ²	0,56	0,99
			100 mW/cm ²	0,48	0,99
			200 mW/cm ²	0,47	0,74
(118)	HeLa	PF-NLC, 0,5 μ g/mL	670 nm Laser, 10 mW/cm ²	0,08	0,09
(119)	HeLa	EDAHB, 0,2 μ g/mL	600-700 nm, 47 mW/cm ²	5,07	3,04
		1 μ g/mL		4,21	4,09
		5 μ g/mL		3,67	3,40
(120)	MCF-7	DTPP, 6 μ g/mL	650 nm laser, 20 mW/cm ²	7,41	0,91
		9 μ g/mL		5,15	2,77
		12 μ g/mL		3,20	2,75
		15 μ g/mL		2,65	3,00
		18 μ g/mL		2,27	3,28

(continua)

(continuação)

		21 µg/mL		1,93	2,33
		24 µg/mL		1,62	1,50
(121)	MCF-7	Indocyanine Green, 32 µM, 24h	730nm, 45 mW/cm ²	42,24	86,68
		50 µM		22,82	51,71
		100 µM		6,81	30,96
(122)	MCF-7	Indocyanine Green, 20 µM, 24h	805 nm laser de diodo, 0,65 W	13,81	27,73
		25 µM		12,61	27,48
		50 µM		11,71	23,42
(123)	MCF-7	Foscan, 1 µg/mL, 3h	650 nm laser de diodo, 2,12 mW/cm ²	0,01	0,04
(124)	MLL	mTHPC, 18h, 0,1 µg/mL	652 nm diode laser, 12 mW/cm ² e 22 mW/cm ²	1,55	1,75
		0,2 µg/mL		0,91	1,06
(106)	A431	AlPcS ₄ , 40 µM	660 nm LED, 2,33 mW/cm ²	0,94	0,97
		Hypericin, 1 µM, 20h	610 nm LED, 2,33 mW/cm ²	0,37	0,31

Fonte: Adaptada de FARIA et al. (4)

4.2 Resultados e Discussões

Considerações gerais

Na figura 10 é mostrado o gráfico de ΔD em função de D_p . Observa-se que ΔD é proporcional a D_p , ou seja, as curvas tendem a se alargar a medida que a dose do pico aumenta. Esse é um comportamento esperado, já que as condições que resultam em baixos valores de D_p são aquelas de alta agressividade (como altas concentrações de fotossensibilizador) e assim, mesmo havendo diferenças entre as células, seu impacto na variabilidade da resposta à TFD é limitado. Nessas condições, o dano causado é grande o suficiente para causar a morte da população em um intervalo estreito de doses de luz, resultando em baixos valores de ΔD . Quando as condições de tratamento se tornam menos agressivas, baixas concentrações de FS, por exemplo, a resposta se torna mais heterogênea, composta pela contribuição de indivíduos sensíveis, que possuem baixos limiares, e resistente, com altos limiares. Isso resulta em uma distribuição dispersa, de valores grandes de largura. Uma das hipóteses para essa dispersão, ou seja, a existência de variabilidades na resposta, é a distribuição heterogênea de FS, causada por diferenças na captação entre indivíduos. Quando a concentração de FS é alta, apesar das diferenças entre captação, o número de células que internalizam moléculas suficientes para causar dano irreversível é grande.

É interessante notar que o comportamento linear mostrado no gráfico implica que $\Delta D/D_p$ é aproximadamente uma constante, indicando que a dispersão relativa da distribuição de limiar de dose é independente de D_p . Usando o mesmo software para ajustar esses pontos a uma reta obtém-se um valor de $1,352 \pm 0,86$ para essa constante, o que significa que, para a maior parte dos dados, a largura da distribuição é $D_p \pm 35\%$.

Figura 10 - ΔD em função de D_p para os experimentos mostrados na Tabela 1.
Fonte: FARIA et al. (4)

Análise de estudos com Photofrin®

Foi analisada a dependência das distribuições de limiar de dose com a concentração de fotossensibilizador e a linhagem celular. Na figura 11 é mostrado o produto de D_p e a absorção de FS♦ para as diferentes linhagens. Observa-se que a resposta depende fortemente do tipo celular, as células R3327-AT (quadrados pretos) são as mais resistentes entre as quatro, pois apresentam menores valores de D_p , enquanto as células de carcinoma de pele humano A431 (triângulo invertido rosa) são as mais sensíveis. Uma das possíveis causas para isso é a variação na captação de FS, já foi mostrado que a dependência entre a captação de Photofrin® e sua concentração é linear e que o coeficiente angular depende da linhagem celular. (97)

Para as linhagens em que é possível ver o comportamento de $D_{p,abs}$ (R3327-AT e MLL, tumores de próstata de rato), observa-se que ele é decrescente com a concentração, mas a

♦ Absorção é dada pelo produto da extinção molar para o comprimento de onda usado, obtido de ZHU et al (96), e a concentração de FS.

taxa de redução é diferente entre elas, sendo seis vezes maior para as células MLL (círculos vermelhos). Isso indica que, entre as duas linhagens, as células R3327-AT são mais resistentes a variações de concentração de FS. Com relação a ΔD_{abs} , observa-se que a largura da distribuição de limiar de dose é menor para as células MLL, que também apresentam um comportamento decrescente para esse parâmetro. As células Ypen-1 (triângulo azul) possui valores intermediários, mas a falta de outros pontos impossibilita a análise de seu comportamento em função da concentração de FS.

Figura 11 - $D_p.\text{absorção}$ (a) e $\Delta D.\text{absorção}$ (b) como função da concentração de Photofrin®.

Fonte: Adaptada FARIA et al. (4)

Análise de estudos com Indocianina Verde

Foram analisados experimentos realizados com o fotossensibilizador Indocianina Verde (ICV). Sua absorção não é linearmente dependente da concentração, por isso foram utilizados dados do trabalho de Ladsman et al. para estimar sua dependência no intervalo de 20-100 μM para os comprimentos de onda de 730 e 805 nm. Feito isso, foi possível calcular o produto $D_p.\text{absorção}$ para as distribuições obtidas dos trabalhos de Crescenzi e Montazerabadi (121-122), mostrado na Figura 12.

Figura 12 - D_p.absorção e ΔD.absorção como funções da concentração de ICV.
Fonte: Adaptada de FÁRIA et al. (4)

É observado um comportamento linear de D_p.abs, com ajuste adequado dos pontos por uma reta. Os valores de ΔD.abs também são crescentes com a concentração, mas não se ajustam tão bem a uma reta, portanto não é possível inferir que seu comportamento seja linear. Esse comportamento pode ser consequência de um mecanismo que dificulta a ação fotodinâmica, já que a energia necessária para matar a população aumenta com a concentração com dependência maior que a do coeficiente de absorção do FS, que já estão incluído nos parâmetro do gráfico.

Usando as distribuições de limiar de dose e um ajuste com relação a absorção, foi possível comparar estudos que não utilizaram as mesmas condições de FS e comprimento de onda e observar um comportamento comum entre eles. Isso indica que as distribuições são um modelo válido e permitem a análise da resposta de condições diferentes de comprimento de onda.

Marcadores de apoptose na linhagem A431

Em um dos trabalhos analisados, de Berlanda et al., foi realizada uma comparação entre seis fotossensibilizadores em células humanas de carcinoma de pele (A431) a respeito da fototoxicidade à TFD e atividade apoptótica em função da dose de luz. A partir das curvas de dose-resposta foram obtidas as distribuições de limiar de dose e estas foram comparadas as curvas de atividade apoptótica (Figura 13). Uma observação interessante, discutida no trabalho (4), é que as curvas são similares entre si, com exceção do fotossensibilizador

Fospeg®. Isso indica que, para algumas condições, a curva de distribuição de limiar de dose fornece o intervalo de dose em que a apoptose tem máxima atividade e é a principal causa de morte.

A curva de distribuição de limiar de dose, então, confirma as observações de que o tipo de morte causado por TFD é dependente da dose de luz e concentração de FS. Há um intervalo dessas condições que causa morte por apoptose e autofagia, acima dele, a morte é predominantemente por necrose. É razoável, então, a existência de curvas de limiares de dose diferentes para cada concentração de FS.

É interessante conhecer o tipo de morte causada pela TFD para entender e controlar a resposta do tecido ao dano fotodinâmico. Como mencionado anteriormente, a apoptose e autofagia, apesar de eficientes vias de morte, também podem ativar mecanismos pró-sobrevivência, levando à resistências de alguns indivíduos. Mesmo que a parcela desses indivíduos seja pequena, é possível que haja falha na erradicação tumoral devido a dela, pois sabe-se que poucas células malignas tem capacidade de causar repopulação do câncer. (125)

Adicionalmente, estudos mostram que a morte por necrose produz resposta inflamatória mais pronunciada, devido ao extravasamento de componentes celulares e líquido na matriz extracelular. Dessa forma, a necrose, que não desencadeia tantos mecanismos de reparo e estimula maior resposta imunológica, tem menor potencial para gerar resistência e sobrevivência tumoral. No entanto, em algumas aplicações, como em tumores cerebrais, onde o inchaço e inflamação são indesejados, a apoptose é esperada em detrimento da necrose. (13)

Portanto, é interessante conhecer o tipo de morte gerado por uma dada condição de TFD, para um determinado tipo celular. A distribuição de limiar de dose pode ser uma ferramenta simples e de custo acessível para isso, já que o pico da distribuição parece ser próximo ao de atividade das caspases, o que indica a atividade apoptótica nas células.

Figura 13 - Curvas de distribuição de limiar de dose e marcadores de apoptose para os FS (a) Photofrin, (b) ALA, (c) Hipericina, (d) AlPcS₄ e (e) Fospeg.

Fonte: FARIA et al. (4)

5 Experimentos de estudo da $g(D_{th})$

5.1 Introdução

Foi observado na análise de curvas da literatura que não existem muitos estudos com condições similares de tratamento, eles se diferenciam por diversos parâmetros (linhagem celular, tipo e concentração do FS, tempo de incubação, comprimento de onda de excitação e intensidade de iluminação). Por esse motivo, para a segunda etapa deste trabalho, experimentos foram realizados para se obter curvas de distribuições de limiar de dose, de modo que essas condições fossem controladas. Para isso, foram usados modelos normais e neoplásicos de células derivadas de tecido hepático e, na linhagem tumoral, foi realizado e estudado um protocolo de indução de resistência. Adicionalmente, foram investigadas a captação do FS por essas células usando a técnica de microscopia confocal.

Células hepáticas

Existem diversos trabalhos a respeito de limiar de dose em fígado de rato. (126–134) Esses estudos relataram que, no fígado, após a TFD é observada uma borda bem definida que delimita a região de necrose, o que condiz com o conceito de limiar de dano acima do qual as células morrem. Além disso, foi mostrado que a profundidade de necrose é proporcional ao logaritmo da dose de luz entregue e a dependência com o comprimento de onda segue a do coeficiente de extinção molar do FS. Devido a essas informações, a investigação de distribuições de limiar de dose *in vitro* nesse trabalho foi feita em células de fígado humanas. Foram usados um modelo de células normais, HepaRG, e tumorais (HepG2).

Hepatócitos humanos primários (HHP) são o modelo padrão ouro para estudos de citotoxicidade, mas a disponibilidade limitada de amostras humanas frescas, procedimentos complexos de isolamento, curto tempo de vida, variabilidade inter-individual, e alto custo limitam seu uso. (135-136) A linhagem HepaRG, apesar de ser derivada de hepatoma, exibe funções hepáticas, expressão de genes, enzimas xenobióticas e receptores nucleares específicos a níveis comparáveis de hepatócitos primários, diferentemente da linhagem tumoral HepG2. (137–139) Por estes motivos, essas células estão sendo amplamente usadas como substitutas de HHP em estudos de citotoxicidade.

As células HepG2 são um modelo tumoral bem estabelecido isolado de um hepatocarcinoma. Elas são usadas em pesquisas de câncer, metabolismo xenobiótico e toxicidade hepática *in vitro*. Apesar de morfológicamente similares a células hepáticas parenquimais, existem muitas diferenças entre as células HepG2 e o tecido de fígado normal, como alterações nos genes P450 (140-141)

Resistência em TFD

O conceito de resistência celular induzida por terapia é bem estabelecido em outras modalidades de tratamento (como quimioterapia e radioterapia): é um fato conhecido que tumores recorrentes são mais resistentes aos tratamentos previamente aplicados. (142) Esse é um dos principais limitantes de terapias anti-tumorais, o que leva a uma extensa investigação de seus mecanismos em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Os tumores podem apresentar uma grande heterogeneidade molecular, o que lhes confere diferentes sensibilidades de vias de resposta a tratamentos. (143) A resistência pode ocorrer devido a seleção de subpopulações de células que possuem naturalmente limiares mais altos de dano (resistência intrínseca) ou por alterações desenvolvidas nas células decorrentes do tratamento, denominada resistência extrínseca. (144) A população que crescerá a partir dessas células pode apresentar características alteradas de migração, divisão, adesão, morte celular e também o aparecimento de mutações, que podem afetar o crescimento global tumoral ou uma nova sessão de terapia. (145)

Em quimioterapia, modelos de resistência foram desenvolvidos pela exposição das células a concentrações crescentes de uma droga. Posteriormente, as células derivadas desse processo eram avaliadas em termos de viabilidade ou proliferação frente a exposição ao quimioterápico. Para avaliar o aumento da resistência, é utilizado um índice, dado por:

$$\text{Índice de resistência} = \frac{\text{LD50 células resistentes}}{\text{LD50 células parentais}}$$

onde LD50 é a dose ou concentração que produz 50% de morte da população. Em quimioterapia, alguns estudos relatam o aumento de 2500 na resistência em comparação com as células parentais e que, além disso, as células apresentaram inter resistência a outros fármacos. (146) Esse índice se relaciona ao deslocamento da curva relativo, mas não fornece a distribuição e nem as informações adicionais que se obtém dela.

O método de aplicação de sucessivas sessões de tratamento é muito comum em estudos no assunto e tem sido o mais utilizado em trabalhos de resistência a TFD. Sua consequência nas distribuições de limiar de dose é o deslocamento do pico das curvas à medida que a população se torna mais resistente, mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Deslocamento das distribuições de limiar de dose devido a aplicação de sucessivas sessões de TFD.

Fonte: Elaborada pela autora

Com esse método, células resistentes foram obtidas com alguns FS exógenos (Photofrin e ftalocianinas) e também com a protoporfirina IX a partir dos precursores ALA ou metil-5-aminolevulinico ácido (MAL). Usualmente, a concentração de FS usada e/ou a dose de luz são aumentadas ao longo das sessões de TFD. Na Tabela 2 são listados os trabalhos em resistência a TFD, seus protocolos de tratamento e os índices de resistência observados. (145)

Dentre os métodos *in vitro* de indução de células resistentes, existem distinções: a seleção de células resistentes da cultura original e o isolamento de clones. A primeira consiste na aplicação de sucessivas sessões de tratamento nas células sobreviventes à sessão anterior. A segunda se baseia na diluição limitada de clones resistentes, que pode ser realizada ao final das sessões de TFD ou após cada um dos tratamentos. (145)

Além dos protocolos *in vitro*, existem métodos *in vivo* de seleção, que fornecem a vantagem da inclusão de fatores vasculares, imunes e interação com os tecidos adjacentes. Nessa metodologia, tumores são induzidos injeção de células em animais imunossuprimidos. Em TFD existem poucos trabalhos que realizam esse estudo. (109,114,147-148)

A caracterização das células resistentes usualmente se dá pela avaliação de morfologia e metabolismo (capacidade de plaqueamento, tempo de duplicação, conteúdo de proteína), acumulação e localização do FS, expressão de mutações e alterações genéticas. Alguns trabalhos também investigam a capacidade e período de latência para indução de tumor e

metástase em animais (109,114), nesses estudos foi observado que era necessário maior número de células resistentes para induzir tumores de mesmo volume que os das células parentais.

Existem diversos fatores que podem estar envolvidos na resistência a TFD. A captação e acumulação do FS pode ser sub ótima em algumas células ou regiões do tumor, a produção de EROs ser insuficiente ou heterogênea, ou as vias de reparo e sobrevivência serem mais pronunciadas e eficazes. (149) Ainda não são entendidos os mecanismos de ação da resistência em TFD e, nos estudos realizados, são relatadas observações distintas entre as células. Além disso, o comportamento *in vitro* avalia uma característica intrínseca de cada célula. Em um tecido, a ação sistêmica adiciona muitos fatores importantes.

Tabela 2 - Estudos em resistência a TFD e suas condições de tratamento.

Referência	Origem		Condições de tratamento					Tipo de seleção	Aumento no índice de resistência
	Tipo celular	Espécie	Tipo tumoral	FS e concentração	Tempo de incubação	Dose de luz (J/cm ²)	Nº de ciclos		
(109)	RIF-1	Camundongo	Fibrosarcoma induzido por radiação	Porfirina (25 µg/ml)	1h	0,2-0,84	10	Clonogênica	1,2-1,5 unidades log
(150)	RIF-1	Camundongo	Fibrosarcoma induzido por radiação	Ftalocianina Zinco(II) piridínio (0,98-9,8 µM) Poli-hematoporfirina (2-25 µg/ml)	1h 16h	3	15	População total	7,1 2,5-3 unidades log
(151)	HT29	Humano	Adenocarcinoma de cólon	Photofrin (1-100 µg/ml) Nile Blue A (1-3 µg/ml) ALPcS (25-60 µg/ml)	4-18h 0,5-1h 4-18h	2,7 8,1 5,4	1-14 1-8 1-11	Clonogênica	1,5 2,62 2,16
(114)	LM3	Camundongo	Adenocarcinoma mamário	ALA (0,6 mM)	3h	0,36-5,4	13	Clonogênica	6,7 (Cl4) e 4,2 (Cl2)
(152)	CL1-5 A375 MDA-MB-231	Humano	Adenocarcinoma de pulmão Melanoma Carcinoma de mama	ALA (1mM)	3h	3-18 1-9 1-6	5	População total	-
(153)	SCC-13	Humano	Carcinoma escamoso	Me-ALA (1mM)	4h	7,31-25	10	População total	8,5-9,5
(154)	FaDu	Humano	Carcinoma escamoso de faringe	Hematoporfirina (1 ou 2 µM)	24h	4,5	15	População total	7,77-12,25

Fonte: Adaptada de ZAMARRÓN et al. (145)

Microscopia Confocal

Em um microscópio convencional de campo amplo, amostras espessas produzem uma imagem que representa a sobreposição de detalhes de alta resolução da região do foco e imagens desfocadas das outras regiões. Esse efeito não prejudica imagens de pequena magnificação (menor que 10×), em que a profundidade do campo (distância entre os planos inferior e superior da região do foco) é grande. No entanto, objetivas de maior aumento possuem altos valores de abertura numérica, resultando em profundidades de campo limitadas. Consequentemente, amostras de espessura maior que 3-5 μm produzem imagens em que a maior parte da luz se origina de regiões fora do foco, ou seja, imagens de baixo contraste. A diferença básica entre essa técnica e a microscopia confocal é a adição de uma abertura (como um *pinhole*) no caminho do feixe que forma a imagem (como mostrado na Figura 15). (5) Isso exclui as contribuições originadas fora do foco pois elas não convergem na abertura e, portanto, são bloqueadas por ela. (150) Dessa forma, a imagem confocal é como uma secção óptica de um plano de uma amostra que pode ter espessura considerável. A resolução da direção z (perpendicular ao plano focal) é em geral da ordem de 0,4-0,8 μm , dependendo do comprimento de onda de excitação. (5)

Figura 15 - Esquema simplificado do funcionamento de um microscópio confocal.
Fonte: Adaptada de JENKINS et al. (151)

5.2 Materiais e Métodos

Linhagens e cultivo celular

A linhagem HepG2 foi obtida da ATCC (American Type Culture Collection, HB-8065 and HTB-22) e as células HepaRG, da Gibco (HPRGC10). Para cultivo, as células criopreservadas foram retiradas do nitrogênio líquido (-189°C) e imediatamente colocadas em banho maria a 37°C para descongelamento. Em seguida, elas foram colocadas em garrafas de cultivo a um inóculo de $0,5 \times 10^5$ células/ml em meio de cultura apropriado, suplementado com 10% de soro fetal

bovino (SFB). Para essas linhagens, o meio utilizado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium – Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) com fenol, um indicativo de pH. Todos os procedimentos de manipulação de células foram realizados em um fluxo laminar (Esco, Class II Biohazard Safety Cabinet), sempre esterilizado anteriormente à manipulação com álcool 70% na superfície de trabalho (assim como todos os materiais que eram colocados dentro do ambiente de trabalho) e irradiação com lâmpada UVC por 30 minutos. Em contato com as células, só foram utilizados materiais estéreis e os líquidos eram climatizados a 37°C antes da manipulação. As células eram mantidas em estufa (Estufa Sanyo MCO 17AC) a 37°C e 5% de CO₂, e a cada dois dias o meio de cultura era trocado para garantir o fornecimento de nutrientes e manutenção do pH ideal. Quando necessário, as células eram sub-cultivadas, ou seja, retiradas das garrafas e colocadas em novas a uma concentração menor, numa razão de 1:2 a 1:4 células (uma parte em mL de células e outra parte em mL de meio de cultura). Para esse procedimento, o fundo das garrafas era lavado com tampão fosfato (PBS) para remover os traços de SFB e então era adicionada uma solução de 0,2% tripsina e 0,5 mM EDTA. A garrafa era mantida nessa solução na incubadora até que as células se desprendessem, respeitando o tempo máximo de 2-3 minutos, para evitar morte por ação da tripsina. Depois disso, era adicionado meio de cultura suplementado com SFB para inibir a ação das enzimas e proteger as células de dano. As células eram então centrifugadas a uma velocidade de 125 g por 3 min (Eppendorf, modelo 5702).

A morfologia das células era analisada em um microscópio invertido (Zeiss, modelo Observer.Z1). Este equipamento foi usado para a avaliação rotineira da manutenção das linhagens, para mensurar a viabilidade celular pela técnica do azul de tripan e para investigar alterações morfológicas após a TFD. O software do equipamento possui ferramentas de cálculo de distâncias e área das imagens obtidas e com ele foram feitas medidas para estimar a área de algumas células.

Fotossensibilizador

Foi escolhido o derivado de hematoporfirina Photogem® (High Chemical Technology, Moscou, Rússia) como fotossensibilizador desses estudos, principalmente devido a sua ampla aplicação clínica em TFD no Brasil. Esse produto é um complexo de oligômeros de porfirina com propriedades químicas, físicas e terapêuticas idênticas ao Photofrin®, um FS usado na Europa, América do Norte e Ásia para o tratamento de diversos tumores.

Antes do uso do Photogem® nos experimentos de TFD, foram realizadas medidas de absorbância e fluorescência em meio de cultura para garantir que suas propriedades fotoquímicas eram mantidas e estavam de acordo com a literatura. Ao longo do período de experimentos, foram preparadas duas soluções estoque de Photogem® na concentração de 5mg/ml em tampão fosfato (PBS) e estas foram mantidas a 4°C protegidas da luz. Todos os procedimentos envolvendo FS eram realizados no escuro. Para as medidas de absorbância e fluorescência, foram preparadas soluções de 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 µg/ml de Photogem® em meio de cultura (DMEM, 5% de SFB). Estas foram medidas no espectrofotômetro SpectraMax® M3 (Molecular Devices, California, EUA) em cubetas de quartzo de 1 ml, para os estudos de fluorescência, onde as soluções eram excitadas em 405 nm. Os espectros de absorbância e fluorescência foram obtidos nos intervalos de 30-850 nm e 500-800 nm com pontos obtidos a cada 5 nm em uma média de 10 medidas cada.

Fonte de Luz

A fonte de luz usada para todos experimentos, denominada Biotable® (Laboratório de Apoio Técnico, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil) e mostrada na Figura 16 é composta por LEDs com emissão predominante em 630 nm com irradiância de 45 mW/cm². A emissão no vermelho foi escolhida devido à proximidade da banda Q de absorção do Photogem®, mostrada à seguir no texto (Fig. 20). Apesar de não ser o comprimento de onda correspondente à maior absorção do FS, possui maior penetração na pele comparada a outras bandas. Esse equipamento foi projetado para a iluminação de placas de 96 poços a uma distância fixa do fundo da placa. A distribuição de irradiâncias ao longo dos poços foi medida com um Espectrofotômetro (Ocean Optics, USB2000+) e sensor (Sony, ILX511B)

Figura 16 - Imagem da fonte de luz usada nos experimentos, a Biotable® 630 nm. À direita, uma placa sendo iluminada. Fonte: Elaborada pela autora.

Captação do Photogem® - Microscopia confocal do FS intracelular

Os testes de captação foram importantes para avaliar a incorporação do Photogem® como função do tempo de incubação e a concentração de FS, o que não só permitiu a definição do protocolo de TFD como também é uma ferramenta importante no entendimento dos resultados.

Para esses experimentos, 24 h antes da incubação com FS, 1×10^6 células eram plaqueadas em placas de Petri de 3 cm de fundo com lamínula (Ibidi, modelo 81158). Essas placas permitem a aquisição de imagens com maior resolução do que as placas de Petri convencionais. Soluções de meio de cultura (DMEM, sem fenol, 5% de SFB) com Photogem® foram preparadas a partir da solução estoque do FS. O meio de cultura do poço era retirado e 1 ml dessas soluções era adicionado. Após o tempo de incubação, as células eram lavadas três vezes com PBS e posteriormente mantidas também em tampão para a aquisição das imagens. A lavagem nesse experimento é importante para impedir a interferência da fluorescência do FS extracelular.

As medidas de cinética da entrada de FS nas células foram realizadas a uma concentração única de Photogem® (5 µg/ml) em tempos de incubação de 1, 4 e 24 horas com a linhagem tumoral HepG2. As placas foram preparadas de forma que o fim desses intervalos fosse simultâneo. Após esse experimento, foi determinado o tempo padrão de incubação de 4 horas. Com ele, foi investigada a captação de FS nas concentrações de 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 µg/ml nas células HepG2 e HepaRG.

Também foi realizado um experimento para investigar diferenças na captação de FS entre as células tumorais HepG2, as resistentes HepG2-R e a linhagem HepaRG. Nele, foi utilizada a concentração de 5 µg/ml de Photogem® e tempo de incubação de 4 h.

As imagens foram obtidas no Microscópio Confocal Zeiss (modelo LSM 780 invertido, equipamento multiusuário, processo FAPESP 2009/54035-4) com excitação em 405 nm por um laser de diodo. O sistema é composto por um laser Diodo (emissão: 405 nm), argônio (458/488/514 nm), HeNe (543/594/633 nm) para excitação por um fóton e laser Ti:Safira (690-1050 nm) para excitação por dois fótons. O microscópio é equipado com detectores GaAsP de alta sensibilidade para imagem espectral (400-700 nm), detectores NDD (Non-

Descanned Detector) operando nos modos de reflexão e transmissão apropriados para imagens por excitação de dois fótons e de emissão de segundo e terceiro harmônicos e dois detectores de avalanche para espectroscopia e imagem de tempo de vida da fluorescência. Também possui uma câmara de CO₂ com controle de temperatura para imagens de culturas celulares não fixadas.

Para esse estudo foram obtidas imagens de 0,3 mm² com as objetivas de 20x no modo espectral, que é uma função que realiza a varredura da emissão de fluorescência no intervalo de 443-688 nm, e no modo de dois canais usando os intervalos de 500-530 nm (mostrado na imagem em verde) e 650-680 nm (mostrado em vermelho), onde é feita a sobreposição da imagem de campo claro e desses canais específicos. O software Zen®, do microscópio, possui algumas ferramentas de análise, como por exemplo, o cálculo de intensidade média da imagem ou de uma região dela ou a distribuição espacial de intensidades ao longo da imagem na função "Histo" (Figura 17). Ele foi usado para obter as intensidade médias das imagens do modo de canais, foram eliminadas as intensidades baixas (< 2), que correspondiam ao fundo da placa, e muitas altas (>200), que eram originadas de regiões saturadas.

Figura 17 - Imagem da interface do software Zen®, na função "Histo", que fornece a intensidade média de um canal de fluorescência.

Fonte: Elaborada pela autora.

Curvas de dose-resposta e distribuições de limiar de dose

Para obtenção das curvas de dose resposta, experimentos foram realizados em placas de 96 poços. 24 hs antes da TFD, as células eram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/poço em 200 µl de meio de cultura, foram usados os poços em que a iluminação é mais homogênea, como mencionado anteriormente. As placas foram mantidas em estufa até o momento de incubação, a 37°C e 5% CO₂. Foram preparadas soluções de meio de cultura (DMEM, sem fenol, 5% de SFB) com Photogem® a partir da solução estoque do FS, o meio de cultura dos poços foi então trocado por essas soluções. As concentrações utilizadas foram 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 µg/ml, cada uma realizada em quadruplicata, a um volume de 100 µl por poço. Após 4h de incubação, em que as placas eram mantidas na estufa, protegidas da luz, os poços eram lavados duas vezes com PBS. Essa etapa é importante para garantir que o fotossensibilizador que não foi captado pelas células seja retirado e não cause dano celular. Após a lavagem, era adicionado 200 µl de meio (DMEM, sem fenol, 5% de SFB) e as placas eram iluminadas na Biotable®. As doses avaliadas foram: 0; 7,5; 15; 22,5; 37,5 e 82,5 J/cm², cada uma em uma placa separada. A iluminação era feita por um tempo correspondente a dose desejada, a partir da equação:

$$D = I \cdot t \quad (5)$$

onde D é a dose de luz (J/cm²), I é a irradiância (mW/cm²) e t é o tempo em segundos. Após a iluminação, as células foram mantidas na estufa, protegidas da luz, por 20h. Esse período é necessário para avaliar a resposta à TFD pois os processos celulares relacionados à morte ou mecanismos de reparo demoram algumas horas para acontecer. Assim, a diferença de viabilidade observada entre os grupos é confiável, e não devido a alterações temporárias. Após esse intervalo, a viabilidade é avaliada pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (Sigma-Aldrich n° cat. 2128).

Esse teste é utilizado para avaliar proliferação ou viabilidade celular, e se baseia na conversão de formazan, um sal azul insolúvel, pelas mitocôndrias de células viáveis. Os cristais são então solubilizados e a absorbância, ou densidade óptica, é medida em 570 nm. O sinal colorimétrico é proporcional ao número de células viáveis.

Para esse ensaio, as células são incubadas por 3h com 100 µl de uma solução de 10% de MTT (5mg/ml), preparado anteriormente pela diluição do sal em tampão fosfato, e 90% de meio

(DMEM, sem fenol, 5% de SFB). Após o fim do tempo de incubação, a solução é retirada e 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) são adicionados para solubilização do formazan. Esse protocolo de solubilização foi descrito por Liu et al. (152)

A densidade óptica das amostras foi então medida em 690 nm e 570 nm por um Espectrofotômetro de placa (Multiskan GO, ThermoScientific) após 5 min de agitação no equipamento. A leitura em 690 nm é realizada para se extrair interferências da absorbância devido a placa e outros fatores que geram um sinal de fundo, o corante não interage com esse comprimento de onda. O sinal de densidade óptica é a subtração da medida em 570 nm pela de 690 nm. Essa diferença é usada para calcular a viabilidade relativa das amostras de acordo com a relação:

$$Viabilidade = \frac{\text{média DO do grupo tratado}}{\text{média DO do grupo controle}}. \quad (6)$$

A morte celular é calculada como (1-viabilidade). Esse experimento de TFD foi repetido três vezes, no mínimo. Para a obtenção das curvas de dose-resposta, foi usada a média dos experimentos para cada dose e concentração de FS. Para o ajuste das curvas a esses pontos, foi usado o software Origin®, num procedimento similar ao realizado para os dados da literatura (capítulo 4). Os pontos foram ajustados usando o modelo Logístico, que apresentou o melhor parâmetro de ajuste, dado pela equação:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 - (x/x_0)^p} + A_2 \quad (7)$$

onde A_1 e A_2 são os valores iniciais e finais, respectivamente, x_0 é o valor central da curva e p a potência. Tomando a derivada dessas curvas, foram obtidas suas respectivas distribuições de limiar de dose. Os parâmetros das distribuições dose do pico (D_p) e dispersão (ΔD) foram calculados da mesma forma mencionada anteriormente.

Protocolo de resistência

Foi realizado um protocolo de indução de resistência na linhagem HepG2. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² sob procedimento descrito anteriormente. A uma confluência de 80%, era realizada uma seção de TFD. O procedimento realizado foi similar ao descrito na seção anterior. As células eram incubadas com uma solução de DMEM (sem fenol, 5% de SFB) a uma concentração de 5 µg/ml por 4 horas. Após esse período, a garrada era

lavada duas vezes com PBS e meio sem fenol era adicionado, a um volume de 5 ml. A iluminação foi realizada na Biotable®, usando uma adaptação para a garrafa de 25 cm², na região correspondente à melhor homogeneidade de irradiância. Em seguida, a garrafa foi colocada de volta na estufa, onde permaneceu até o dia seguinte, quando foi feita a troca do meio de cultura. A viabilidade era significativamente reduzida, mas algumas células sobreviviam e eram, então, responsáveis pela repopulação da garrafa. As células eram então cultivadas com a troca de meio regular até que atingissem a confluência de 80%, quando era realizada outra sessão de TFD. Esse procedimento se repetiu até que se completassem 10 sessões. Nesse momento, após a recuperação da confluência, as células foram passadas para garrafas de 75 cm² a uma razão de 1:3. Parte dessas células, denominadas então HepG2-R, foi então criopreservada, procedimento que não altera a resistência adquirida, como foi observado em experimentos posteriores e também em trabalhos de outros grupos em resistência induzida por TFD. (114) O restante das células foi utilizado em experimentos de caracterização de resistência.

5.3 Resultados e Discussões

Linhagens celulares

Na Figura 17 são mostradas microscopias das linhagens celulares utilizadas. Observa-se que as células possuem características diferentes entre si, a linhagem HepaRG (Fig. 18, painel a) possui morfologia mais dendrítica que as tumorais, que crescem em pequenas aglomerações. Entre as células HepG2 (Fig. 18, painel b) e HepG2-R (Fig. 18, painel c), percebe-se pelas imagens que a resistente possui maior área por célula. Esse parâmetro foi medido usando o software do microscópio e foram obtidos os valores 510,10 µm² para a HepG2 e 609,63 µm² para a HepG2-R, representando um aumento de 19,5%. Apesar de esse não ser um fato comum a células resistentes a quimioterápicos, em estudos da literatura em resistência a TFD é possível encontrar observações similares. Casas et al. relataram um aumento de aproximadamente duas vezes no volume de células resistentes a ALA-TFD derivadas da linhagem de adenocarcinoma murinho LM3. (114) Também foi observado aumento em células de fibrosarcoma RIF resistentes com o FS Photofrin® em dois estudos. (109, 153) Certamente, o tamanho e forma são fatores que se relacionam à membrana celular. Como a

TFD interage fortemente com a membrana, faz sentido que diferentes formatos possam resultar em respostas diferentes e que a ação fotodinâmica possa alterar a morfologia.

Figura 18 - Morfologia das células (a) HepaRG, (b) HepG2 e (c) HepG2-R.
Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliação da resistência das células HepG2-R, também foram obtidas imagens (Figura 19) da resposta pós-TFD entre essa linhagem e sua parental, HepG2. As imagens (a) e (b) foram obtidas antes da TFD, (c) e (d) 4 horas após a iluminação, (e) e (f) 18 horas e, (g) e (h), 24 horas. Nas imagens de 4 hs, percebe-se um inchaço das células mais pronunciado na linhagem resistente. Essa observação foi relatada em um estudo anterior, de Leunig et al., em três tipos celulares diferentes após uma sessão única de TDF com Photofrin. (154) Esse efeito pode ser consequência de influxo ou formação de compostos osmóticos no interior das células, como ácido láctico, originado da glicólise induzida por dano, e cálcio resultante da despolarização de membrana. (155) Além disso, nas células HepG2 da imagem (c) observa-se a formação inicial de vacúolos intracelulares em algumas células, que ficam mais evidentes na imagens de 18 hs (e), onde também é possível identificar alguns corpos apoptóticos. Alguns desses eventos foram destacados nas imagens por linhas brancas sólidas. Nas células HepG2-R esses efeitos são menos evidentes e as células, no geral, aparentam menor dano. Além disso, fica claro nas imagens de 24 hs que a redução de células aderidas HepG2 (em comparação com a imagem de antes do tratamento) é maior do que a observada para as resistentes. Adicionalmente, após 24 hs pós a TFD o inchaço das células HepG2-R foi significativamente reduzido, o que pode indicar que mecanismos de reparo foram eficientes para reverter os danos da TFD.

Figura 19 - Imagens pós-TFD das linhagens HepG2 (esquerda) e HepG2-R (direita). 0 hs (a) e (b), 4 hs (c) e (d), 18 hs (e) e (f), 24 hs (g) e (h) pós TFD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Caracterização Photogem®

Os resultados dessas medidas são mostrados na Figura 20. São mostrados o espectro de absorvância da solução de 5,0 $\mu\text{g/ml}$ e os espectros de fluorescência das concentrações de 2,0-5,0 $\mu\text{g/ml}$ de Photogem® em DMEM. Também é mostrada a dependência da fluorescência com a concentração de FS, obtida a partir do valor do pico de 620 nm. A diferença máxima entre as medidas de fluorescência da primeira e segunda soluções estoque foi de 20%. Preparações a partir da mesma solução estoque apresentaram diferenças de aproximadamente 15%, por isso, o valor de 20% foi considerado aceitável.

Figura 20 – Medidas de absorvância (superior) e fluorescência (inferior) de soluções de Photogem® em DMEM.
Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a absorvância, pode-se notar os picos de 380, 500, 540, 570 and 620 nm, que correspondem as bandas de Soret (370 nm) e Q (507, 540, 570 e 620 nm) do Photogem® relatadas na literatura. (156) Dos espectros de fluorescência, no intervalo de 500-800 nm, observam-se os picos de emissão em 620 e 670 nm e a dependência linear da fluorescência

com a concentração de FS. Essas observações estão em concordância com uma extensa literatura das propriedades fotoquímicas das porfirinas. (157)

Biotable®

A distribuição de irradiâncias é mostrada na Tabela 3. Com base nessa distribuição, os poços utilizados para os experimentos foram os C2-C10, com quadruplicatas na vertical, ou seja, linhas C-F, pois essa é a região de maior homogeneidade de iluminação. Um esquema ilustrativo dos poços usados é mostrado na Figura 21. A irradiância nesses poços varia entre $45 \pm 2,5 \text{ mW/cm}^2$.

Tabela 3 – Distribuição de irradiância (mW/cm²) na Biotable® 630nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	39,75	42,82	42,91	44,14	43,83	44,55	43,65	44,32	43,38	43,54	40,92	33,97
B	44,38	46,17	45,91	47,11	46,39	47,86	46,98	47,53	46,90	47,02	44,19	37,90
C	43,60	45,73	45,66	46,81	46,11	47,20	46,45	47,20	46,29	46,42	43,59	37,93
D	42,94	44,91	44,86	45,85	45,36	46,39	45,58	46,69	45,22	45,57	42,60	36,85
E	42,78	45,27	45,13	45,99	45,67	46,14	45,75	46,41	45,39	45,52	42,54	37,44
F	43,63	45,64	45,34	46,45	46,18	47,08	46,27	47,14	46,06	46,23	43,17	37,15
G	43,89	46,75	46,30	47,29	46,51	47,32	46,59	47,43	46,56	46,69	43,54	37,98
H	39,55	42,24	41,88	43,18	42,91	43,53	42,94	43,45	42,69	42,42	39,70	33,16

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 - Esquema ilustrativo da disposição dos poços utilizados (em tons de bege) na placa de 96 poços.
Fonte: Elaborada pela autora.

Captação de Photogem®

Na figura 22 são mostradas as imagens de microscopia de fluorescência confocal, no modo espectral, das células HepaRG e HepG2, nas concentrações de Photogem® 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0

$\mu\text{g/ml}$. Nesse modo, o comprimento de onda é mostrado numa escala crescente que vai do azul ao vermelho. Dessa forma, a autofluorescência, que se concentra na região de 500-530 nm, é mostrada em verde e a fluorescência do Photogem®, que, como mostrado pelos espectros anteriores, tem picos em 620 e 670 nm, é mostrada em vermelho.

Pelas imagens, é evidente que a captação de FS aumenta com a concentração, fato confirmado por estudos anteriores. (158) Adicionalmente, observa-se que o FS não penetra a membrana nuclear e que se concentra ao redor dela.

Na Figura 23, são mostradas imagens de microscopia confocal, no modo de sobreposição dos canais de autofluorescência e fluorescência do FS, das três linhagens utilizadas nesse trabalho na concentração de 5,0 $\mu\text{g/ml}$ de Photogem®. Na figura também é mostrado um gráfico com as intensidades médias de autofluorescência e fluorescência do FS para as três linhagens, obtidas a partir de cinco imagens diferentes de cada.

Pelas imagens e gráfico, percebe-se que a linhagem HepaRG possui a maior intensidade de autofluorescência, quando comparada com as outras duas linhagens. Nessa região espectral, com excitação em 405, autofluorescência é originada, principalmente, pela emissão de flavinas, como o FAD, e alguns lipídios. (159) Na Tabela 4 é mostrada a excitação/emissão de algumas moléculas do ambiente intracelular.

Tabela 4 - Excitação e emissão de moléculas responsáveis pela autofluorescência das células.

Molécula	Pico de excitação (nm)	Pico de emissão (nm)
FAD	450	535
Fosfolipídeos	436	540, 560
Lipofuscina	340-395	540, 430-460
Ceróide	340-395	430-460, 540

Fonte: Adaptada de RAMANUJAM et al. (10)

Quanto a captação de FS, a diferença entre as células é ainda maior. A linhagem tumoral HepG2 é a que apresentou a maior fluorescência média na região de emissão do Photogem®, seguida das células resistentes e, por último, da HepaRG. A redução da captação pelas células resistente também foi observada no estudo de Luna et al., que relatou um pequeno aumento na contração de Photofrin®/célula em células RIF. (109) Os mecanismos que regulam a captação de FS em células resistente ainda precisam ser elucidados, visto que, atualmente, existem poucos trabalhos que exploram esse tópico.

Figura 22 – Microscopia Confocal da captação de Photogem® pelas células HepaRG (superior) e HepG2 (inferior), após 4h de incubação, a concentrações de a) 2 µg/ml; b) 2,5 µg/ml; c) 3 µg/ml e d) 5 µg/ml. A fluorescência do FS é mostrada em vermelho e, a autofluorescência, em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 23 - Microscopia Confocal das células (a) HepaRG, (b) HepG2 e (c) HepG2-R. Imagens de sobreposição dos canais de autofluorescência (520 nm), fluorescência do Photogem (630 nm) e de campo claro.

Fonte: Elaborada pela autora.

A diferença entre a captação da linhagem HepaRG e as células tumorais é vista nas Figuras 22 e 23, sendo muito maior para a HepG2. Como as células HepaRG se assemelham aos hepatócitos primários, conclui-se que esse comportamento deve ser observado também entre o carcinoma de fígado e o tecido normal desse órgão. Estudos anteriores demonstraram diferenças similares nas concentrações de porfirina entre linhagens de câncer e tecido saio, que resultavam em maior sensibilidade à TFD das células tumorais. (160–163) Böhmer e Morstyn sugeriram que o pH ácido, diferenças em concentração de sêrum podem ser fatores que favorecem a captação de FS por células malignas. (164) O maior acúmulo das células tumorais é possivelmente resultado da diferença entre captação e eliminação do FS. As

células tumorais normalmente possuem mecanismos de liberação deficientes, o que causa o acúmulo de FS e aumenta a seletividade da TFD.

Distribuições de limiar de dose

Os pontos experimentais obtidos e suas respectivas curvas de dose resposta são mostrados na Figura 24. As concentrações de Photogem® de 2,0 a 5,0 µg/ml são mostradas em cores diferentes. As barras de erro representam o desvio padrão da média de três experimentos independentes.

Para obter as curvas de dose resposta os dados foram ajustados como descrito na seção anterior e, as distribuições de limiar de dose, foram obtidas tomando a derivada dessas curvas (Figura 23). Estas foram caracterizadas pelos parâmetros de largura e dose do pico, ΔD e D_p , usando a função “Peak Analyzer” do software Origin®.

Da Figura 24 nota-se que as linhagens apresentam comportamentos de curvas de dose-resposta e distribuição de limiar de dose distintos. As distribuições da linhagem HepaRG são a que possuem maior simetria com relação ao coeficiente de Pearson (Figura 25.a), ou seja, o menor valor para esse parâmetro. Isso significa que os valores de D_p são mais próximos da média de limiar de dose da população, em comparação com as outras linhagens. Além disso, analisou-se a porcentagem de células que possui limiar de dose abaixo de D_p (Figura 25.b). Essa é uma outra maneira de se analisar a simetria da curva e homogeneidade da resposta. O modelo de células normais é novamente o que possui menor desequilíbrio entre os grupos de células com limiar menor que D_p e o grupo com limiares maiores que D_p , ou seja, é a linhagem que possui razão (população com $D_{th} < D_p$ / população total) mais próxima de 0,5.

Com relação ao valor do pico da distribuição, que fornece informações de sensibilidade da população, percebe-se que as células normais são as mais resistentes à TFD por apresentarem maiores valores de D_p . As células tumorais são as mais sensíveis, possuem os menores valores de D_p , seguida das células resistentes. Esse comportamento pode estar relacionado a captação de FS, já que ela também segue essa ordem entre as linhagens (Figura 23). Isso indica seletividade do tratamento e favorece os resultados clínicos da TFD, já que minimiza os efeitos colaterais no fígado normal enquanto promove a morte do tumor. Em outras palavras, a seletividade é garantida.

Figura 24 - Curvas de dose resposta (esquerda) e suas respectivas distribuições de limiar de dose (direita) para as linhagens HepaRG, HepG2 e HepG2-R.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 - Coeficiente de assimetria de Pearson (a) e razão (população com $D_{th} < D_p$ /população total) para as linhagens utilizadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento do crescente valor de D_p com a contração de F_s mostra um comportamento interessante. Pelo gráfico de D_p vs $1/\text{concentração}$ (Figura 26) percebe-se um comportamento linear do tipo $D_p = a + b/\mu$, onde a é o ponto em que a reta intercepta o eixo y , b é o coeficiente angular e μ é a concentração de FS. Quando $\mu \rightarrow 0$, necessita-se infinita energia para causar a morte, ou seja, sem FS não há morte da população, fato que condiz com os mecanismos da TFD. Por outro lado, para $\mu \rightarrow \infty$, os valores de D_p são negativos, o que sugere que a existência de valores de concentração ($\mu_{\max}$) para os quais a energia necessária para causar morte em grande parte da população tende a zero. Esses valores podem ser determinados invertendo a equação da reta para a condição $D_p=0$, resultando em $\mu_{\max}=-b/a$. Para as células HepaRG, HepG2 e HepG2-R foram encontrados os valores 7,88679; 5,76076 e 7,1588 $\mu\text{g/ml}$; respectivamente. Isso não significa que todas as células irão morrer nessas condições, mas não será possível observar um limiar de dose mais frequente, pois distribuição perderá o formato de sino, em que observa-se um pico, pois $D_p \rightarrow 0$. Adicionalmente, comparando os coeficientes das retas, observa-se que as células tumorais apresentam o menor valor de b . Esse parâmetro está relacionado a resistência a TFD: quanto maior o coeficiente, mais resistente é a população. Idealmente, $b \rightarrow \infty$ representaria células incapazes de serem mortas pela ação fotodinâmica independentemente da concentração de FS.

Figura 26 - Gráfico de D_p em função do inverso da concentração para as células de fígado.
Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento geral das distribuições de limiar de dose $g(D_{th})$ com a concentração de FS das células hepáticas é semelhante, as curvas se tornam mais largas e com picos mais distantes da origem à medida que a quantidade de FS é reduzida. No entanto, a dependência dos parâmetros D_p e ΔD não é idêntica entre as três linhagens. Na Figura 27 é mostrada a razão $\Delta D / D_p$, que representa a largura da distribuição relativa ao pico, para as células HepaRG, HepG2, HepG2-R juntamente com esses valores para as células mostradas na Figura 11, obtidas de trabalhos publicados com o FS Photofrin, análogo ao Photogem®. Esse parâmetro é relevante pois sabe-se que, entre as curvas de $g(D_{th})$, a largura aumenta com o valor de D_p , então a comparação entre os valores absolutos de ΔD pode resultar em conclusões incorretas.

Figura 27 - Razão $\Delta D/D_p$ em função da concentração de FS.
Fonte: Elaborada pela autora.

Entre as linhagens de fígado dos experimentos mostrados nessa seção, observa-se que a largura relativa das curvas é maior para as células tumorais de fígado, o que indica que essas células possuem a maior heterogeneidade entre as três. Adicionalmente, esses valores são um dos maiores com relação a todas as linhagens mostradas, o que fornece informações sobre o carcinoma de fígado com relação a outros tumores. As células resistentes são as que possuem valores intermediários de $\Delta D/D_p$ em relação a células de fígado, seguidas das células normais, que possuem os menores valores. Isso é outro indicativo de que o tecido normal possui resposta mais uniforme e homogênea em comparação ao tumor. Além disso, essa observação revela a tendência das células resistentes a se aproximarem do comportamento das células normais, o que pode ser consequência do método de seleção. O isolamento das células resistentes exclui os indivíduos mais sensíveis de uma população originalmente heterogênea.

A linha sólida no gráfico da Figura 27 corresponde ao valor de $\Delta D/D_p = 1,35$, que foi obtido na seção 4 a partir da análise dos dados da literatura. Esse valor é referente ao comportamento geral da largura em relação a dose do pico para todas as condições de tratamento investigadas, sem distinções entre linhagens e FS. Portanto, a posição dos pontos no gráfico em relação a linha indicam qual a diferença entre eles e a média. Dessa forma, observamos que a maior parte dos experimentos realizados com o FS porfirina de sódio (Photofrin® ou

Photogem®) resultam em respostas mais uniformes que a média dos experimentos *in vitro* em TFD. Também concluímos que as células HepG2-R tem comportamento muito similar a média enquanto sua linhagem parental possui valores maiores que 1,35 para a maior parte das concentrações. As células HepaRG tem largura relativa semelhante às R3327-AT, Ypen-1 e A431, menores que a média.

Na Figura 28 são mostradas as curvas $g(D_{th})$, sobrepostas, das linhagens de fígado, separadas por concentração. Dessa forma, fica mais evidente quais parcelas das populações tem mesmo limiar de dose. Também observa-se novamente como as células HepG2-R tendem a se assemelhar ao comportamento da linhagem HepaRG, a partir das curvas das suas células parentais HepG2, suas curvas são aproximadamente a intersecção das curvas das outras.

Figura 28 - Distribuições de limiar de dose das células de fígado, separadas por concentração de Photogem®.
Fonte: Elaborada pela autora.

Protocolo de resistência

O aumento dos valores de D_p é uma confirmação de que o protocolo de resistência utilizado foi eficiente, pois percebem-se diferenças entre as curvas. No entanto, em outros estudos da literatura nesse tópico, observam-se reduções maiores na sensibilidade. São observados aumentos no índice de resistência de até 12 vezes, em células de carcinoma escamoso de faringe, como mostrado na Tabela 2. Todavia, é importante notar que as concentrações de FS

e dose de luz foram significativamente menos agressivas que as relatadas em outros estudos com porfirinas similares. Enquanto o intervalo de doses padrão é de algumas unidades de J/cm^2 , o utilizado nesse estudo foi de 7,5-82,5 J/cm^2 e a concentração de Photogem® utilizada foi 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ao passo que para induzir resistência, são bservadas concentrações de 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na literatura. (145) Além disso, essas condições foram mantidas constantes ao longo das sessões, fato não comum a outros estudos. Isso indica que mesmo condições brandas e não crescentes de tratamentos induzem mudanças na população, seja pela alteração do comportamento celular frente a TFD ou pela seleção de células que são mais resistente intrinsecamente.

Abaixo, na Figura 29, são mostradas as curvas de sobrevivência do trabalho de Luna et al. em células RIF e as distribuições de limiar de dose obtidas a partir delas. É possível observar que o resultado do protocolo de seleção nas curvas $g(D_{th})$ foi semelhante para as linhagens HepG2 e RIF. As curvas das células resistentes possuem D_p maior do que os observados para as células parentais. O valor da razão entre os D_p das células RIF é de 1,18, o que é próximo do índice de resistência 1,2 para essas células.

Figura 29 - Distribuições de limiar de dose para células RIF e seu clone resistente CI8.

Fonte: (esquerda) Elaborada pela autora, (direita) Adaptada de LUNA et al. (109)

Abaixo (Tabela 5) são mostrados os valores de LD50 e D_p para as linhagens tumorais de fígado e suas derivadas resistentes e o índice de resistência calculado a partir deles. Assim como para a linhagem RIF, as concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apresentam índices semelhantes a partir dos dois cálculos. Entretanto, para as concentrações intermediárias, nota-se que o índice calculado com D_p foi muito maior que os obtidos a partir do LD50. Acreditamos que

essa diferença se deve ao comportamento das curvas de dose resposta dessas concentrações no intervalo de baixas doses e que o parâmetro D_p seja mais sensível a essas alterações. Ainda assim, são necessários mais estudos para determinar qual dos métodos de se calcular o índice de resistência melhor representa a resposta das células.

Tabela 5 - Valores de LD50 e D_p para as células HepG2 e HepG2-R.

	Linhagem	2 µg/ml	2,5 µg/ml	3 µg/ml	5 µg/ml
LD50	HepG2	44,00	22,80	15,42	8,23
	HepG2-R	56,37	32,61	24,75	9,98
	Índice de resistência LD50 (HepG2-R/HepG2)	1,28	1,43	1,60	1,21
D_p	HepG2	27,66	8,92	7,10	5,86
	HepG2-R	35,45	22,32	16,28	7,17
	Índice de resistência D_p (HepG2-R/HepG2)	1,28	2,50	2,29	1,22

Fonte: Elaborada pela autora.

6 Conclusões

A terapia fotodinâmica para combate ao câncer apresenta muitos benefícios e os centros de tratamento existentes demonstram que ela pode ser uma alternativa às modalidades convencionais. No entanto, alguns desafios dificultam a popularização e aceitação dessa técnica pela comunidade médica. Dentre eles se destacam a variabilidade nos resultados que pode ocorrer devido a quantidades insuficientes de fotossensibilizador ou dose de luz. Para superar esse desafio, é necessário entender a resposta das populações celulares envolvidas no tratamento (tumoriais e saudáveis) em função dessas variáveis, de modo a propor protocolos de tratamento eficientes.

Nesse trabalho, foi discutido o uso de distribuições de limiar de dose, $g(D_{th})$, para avançar nesse entendimento, que são obtidas a partir de curvas experimentais de dose-resposta. Essas distribuições fornecem informações sobre a resistência da população e a homogeneidade da resposta à TFD através dos parâmetros de dose do pico (D_p) e largura da curva (ΔD), respectivamente.

A partir da análise de diversas curvas de dose-resposta da literatura, foram obtidas algumas conclusões a respeito do comportamento das distribuições de limiar de dose. Primeiramente, observou-se que a largura ΔD é proporcional a dose do pico D_p , ou seja, um aumento no limiar de dose mais frequente na população resulta em maior dispersão dos valores de tolerância. Esse estudo também incluiu a análise dos parâmetros ΔD e D_p de acordo com o FS usado, em que se observou a influência do tipo celular no resultado da TFD. Finalmente, essa análise mostrou a correspondência das distribuições de limiar de dose e as curvas de atividade de caspases, que indicam a ocorrência da apoptose em função da dose de luz, para a maior parte dos FS empregados.

A segunda etapa desse trabalho consistiu na realização de experimentos para obtenção de $g(D_{th})$. Foram utilizados modelos de células normais e tumorais de fígado, HepaRG e HepG2, e o derivado de hematoporfirina Photogem, como FS. Além disso, foi aplicado um protocolo de resistência nas células tumorais para avaliação de seu impacto nas distribuições de limiar de dose. Foi observado que as células normais apresentam maior tolerância ao tratamento e menor dispersão relativa quando comparada às linhagens tumorais e resistentes. O protocolo

de resistência foi eficiente, no sentido de que a dose do pico dessas células teve um aumento de 1,2-2,5 em relação a linhagem parental HepG2 e observou-se a tendência das distribuições das células resistentes a se assemelharem às da linhagem normal

Nesse estudo, foi possível mostrar as vantagens do uso do modelo de distribuição de limiar de dose, que possibilitou o estudo e entendimento maior da dependência da resposta à TFD com a linhagem celular e fotossensibilizador usado e a investigação do efeito da aplicação de sucessivas sessões de tratamento em células tumorais.

Referências

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acesso em: 20 dez. de 2016.
- 2 BROWN; S. B.; BROWN; E. A.; WALKER; I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n.8, p. 497–508, 2004.
- 3 SABINO; L. G. et al. Experimental evidence and model explanation for cell population characteristics modification when applying sequential photodynamic therapy. **Laser Physics Letters**, v. 8, n. 3, p. 239–246,, 2011.
- 4 FARIA, C. M. G. et al. Determination of the threshold dose distribution in photodynamic action from in vitro experiments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 162, p. 168–175, 2016.
- 5 PRASAD, P. N. **Introduction to biophotonics**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2003.
- 6 MOREAUX, L. et al. Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. **Optics letters**, v. 25, n.5, p. 320–2, 2000.
- 7 KHURANA, M. et al. Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin® and Visudyne®. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n.6,p. 1441–1448, 2007.
- 8 KOBAYASHI, H. et al. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n.5, p. 2620–40, 2010.
- 9 WAGNIÈRES, G.A.; STAR, W.M.; WILSON; B.C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n.5,p. 603–32, 1998.
- 10 RAMANUJAM; N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. **Neoplasia**, v. 2, n.1-2, p. 89–117, 2000.
- 11 ALFANO, R. R.; KATZ, A. Noninvasive fluorescence-based instrumentation for cancer and precancer detection and screening. In: COHN, G. E.; DOMANIK, (Ed.) **In-Vitro diagnostic instrumentation**. New York: CRC Press,2000. v. 3913. p. 223–226.
- 12 MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Research**, v. 23,n. 5A,p. 3591–3600, 2003.
- 13 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- 14 AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n.4,p. 250–281, 2011.

- 15 SILVA, A. P. et al. A promising strategy for the treatment of onychomycosis with curcumin and photodynamic therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 434–437, 2015.
- 16 MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 4, p. 549–553, 1991.
- 17 MOAN, J. et al. Intracellular localization of photosensitizers. **Ciba Foundation Symposium**, v. 146, n. 11, p. 95–107, 1989.
- 18 NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339–52, 2005.
- 19 DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.
- 20 PROSKURYAKOV, S.; GABAI, V. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 56–68, 2010.
- 21 PETTIGREW, C. A.; COTTER, T. G. Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development. **Discovery Medicine**, v. 8, n. 41, p. 61–63, 2009.
- 22 THORNBERRY, N. A. CASPASES: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312–1316, 1998.
- 23 REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415–1430, 2000.
- 24 RUSTIN, P. Mitochondria, from cell death to proliferation. **Nature Genetics**, v. 30, n. 4, p. 352–353, 2002.
- 25 RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. The central effectors of cell death in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n. 1, p. 781–828, 1999.
- 26 GOUGEON, M. L.; KROEMER, G. Charming to death: caspase-dependent or -independent? **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 3, p. 390–392, 2003.
- 27 PERFETTINI, J. L.; KROEMER, G. Caspase activation is not death. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 308–310, 2003.
- 28 SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 784–788, 2000.
- 29 PLATT, N.; SILVA, R. P.; GORDON, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 365–372, 1998.
- 30 IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–88, 2002.
- 31 WHITE, E. The role for autophagy in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 42–6, 2015.

- 32 KROEMER, G.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 886–897, 2005.
- 33 MROZ, P. et al. Cell Death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 2516–2539, 2011.
- 34 GOSSELIN, K. et al. Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 2, p. 423–435, 2009.
- 35 NAGATA, S. et al. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n.1, p. 64–70, 2003.
- 36 DELLINGER, M. Apoptosis or necrosis following photofrin® photosensitization: influence of the incubation protocol. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 1, p. 182–187, 1996.
- 37 ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): reviews on cancer**, v. 1704, n.2, p. 59–86, 2004.
- 38 OBERDANNER, C. B. et al. Glucose is Required to Maintain High ATP-levels for the Energy-utilizing Steps During PDT-induced Apoptosis¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n.6, p. 695, 2002.
- 39 WYLD, L.; REED, M. W.R.; BROWN, N. J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. **British Journal of Cancer**, v. 84, n.10, p. 1384–1386, 2001.
- 40 OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–21, 2002.
- 41 KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n.1, p. 28–35, 1999.
- 42 CHALOUPKA, R. et al. The effect of hypericin and hypocrellin-A on lipid membranes and membrane potential of 3T3 fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): biomembranes**, v. 1418, n. 1, p. 39–47, 1999.
- 43 CARTHY, C. M. et al. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a porphyrin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. **Laboratory Investigation: a journal of technical methods and pathology**, v. 79, n. 8, p. 953–965, 1999.
- 44 CHIU, S. M.; OLEINICK, N. L. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 84, n.8, p. 1099–1106, 2001.
- 45 GRANVILLE, D. J. et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 305–

311, 2001.

46 GRANVILLE, D. J. et al. Nuclear Factor-kappaB activation by the photochemotherapeutic agent verteporfin. **Blood**, v. 95, n.1, p. 256–262, 2001.

47 XUE, L.; CHIU, S.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy-induced death of mcf-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. **Experimental Cell Research**, v. 263, n.1, p. 145–155, 2001.

48 GAD, F. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 5, n.1,p. 8–13, 2001.

49 RENNO, R.Z. et al. Photodynamic therapy using Lu-Tex induces apoptosis in vitro, and its effect is potentiated by angiostatin in retinal capillary endothelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 41, n. 12, p. 3963–71, 2000.

50 CHAN, W. H.; YU, J. S.; YANG, S. D. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. **Biochemical Journal**, v. 351, Pt. 1,p. 221–232, 2000.

51 ASSEFA, Z. et al. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects hela cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13,p. 8788–8796, 1999.

52 GRANVILLE, D. J.; LEVY, J.G.; HUNT, D.W. Photodynamic therapy induces caspase-3 activation in HL-60 cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 4, n. 7,p. 623–8, 1997.

53 HE, J. et al. Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. **Cancer Research**, v. 58, n. 5, p. 940–6, 1998.

54 YOSHITO, A. et al. Effects of BAPTA-AM and forskolin on apoptosis and cytochrome c release in photosensitized Chinese hamster V79 cells. **Photochemistry & Photobiology**, v. 70, n. 4, p. 650–655, 1999.

55 GRANVILLE, D.J. et al. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. **FEBS Letters**, v. 437, n. 1-2, p. 5–10, 1998.

56 ZHUANG, S.; LYNCH, M. C.; KOCHVAR, I. E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. **Experimental Cell Research**, v. 250, n. 1, p. 203–12, 1999.

57 CORY, S.; HUANG, D. C. S.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8590–8607, 2003.

58 ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998.

- 59 SASNAUSKIENE, A. et al. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. **Apoptosis** : an international journal on programmed cell death, v. 14, n. 3, p. 276–86, 2009.
- 60 SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 422–427, 2007.
- 61 KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Initiation of autophagy by photodynamic therapy. **Methods in Enzymology**, v. 453, p. 1–16, 2009.
- 62 KESSEL, D.; ARROYO, A. S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 6, n. 12, p. 1290–1295, 2007.
- 63 APEL, A. et al. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 5, p. 1485–1494, 2008.
- 64 LI, Y. et al. Highly water-soluble and tumor-targeted photosensitizers for photodynamic therapy. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 28, p. 7681–7694, 2015.
- 65 DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1447–55, 2000.
- 66 ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 67 BUZZÁ, H. H. et al. Photodynamic therapy: progress toward a scientific and clinical network in Latin America. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.213, p. 261-216, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.08.004.
- 68 VOLLET FILHO, J. D. et al. PDT and emerging therapies for actinic keratosis—a resource letter. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. S1572, 2016. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.09.002.
- 69 ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n.1,p. 24–9, 2013.
- 70 ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2,p. 61–75, 2010.
- 71 WAGNER, A. et al. Temoporfin improves efficacy of photodynamic therapy in advanced biliary tract carcinoma: a multicenter prospective phase II study. **Hepatology** , v. 62, n. 5, p. 1456–65, 2015.
- 72 CHAN, W. M. et al. Verteporfin PDT for non-standard indications--a review of current literature. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie, v. 248, n. 5, p. 613–626, 2010.
- 73 ROMANKO, Y. S. et al. Effect of photodynamic therapy with photodithazine on

morphofunctional parameters of M-1 sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 138, n. 6, p. 584–589, 2004.

74 CHIN, W. W. L. et al. The potential application of chlorin e6–polyvinylpyrrolidone formulation in photodynamic therapy. **Photochemical & Photobiology Science**, v. 5, n. 11, p. 1031–1037, 2006.

75 LOBEL, J., et al. 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (HPPH) in a nude rat glioma model: implications for photodynamic therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, n. 5, p. 397–405, 2001.

76 TARDIVO, J. P. et al. A clinical trial testing the efficacy of PDT in preventing amputation in diabetic patients. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 11, n. 3, p. 342–350, 2014.

77 TSENG, S. P. et al. Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, s.1684, 2014. doi: 10.1016/j.jmii.2014.12.007.

78 FRIMBERGER, A. E. et al. Photodynamic therapy of naturally occurring tumors in animals using a novel benzophenothiazine photosensitizer. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 9, p. 2207–18, 1998.

79 PANHÓCA, V. H. et al. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 9, p. pho.2015.4080, 2016.

80 LIU, X. et al. Evaluation of hypericin: effect of aggregation on targeting biodistribution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 1, p. 215–22, 2015.

81 ZHENG, Y. et al. Hypericin-based photodynamic therapy induces a tumor-specific immune response and an effective dc-based cancer immunotherapy. **Biochemical Pharmacology**, S006, 2014. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.036.

82 GOMER, C. J.; RUCKER, N.; MURPHREE, A. L. Differential cell photosensitivity following porphyrin photodynamic therapy. **Cancer Research**, v. 48, n. 16, p. 4539–4542, 1988.

83 WEST, C. M. L. et al. A comparison of the sensitivity to photodynamic treatment of endothelial and tumour cells in different proliferative states. **International Journal of Radiation Biology**, v. 58, n. 1, p. 145–156, 1990.

84 MCMAHON, K. S. et al. Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. **Cancer Research**, v. 54, n. 20, p. 5374–9, 1994.

85 KORBELIK, M.; CECIC, I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 137, n. 1, p. 91–98, 1999.

86 DE VREE, W. J. et al. Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. **Cancer Research**,

v. 57, n. 13, p. 2555–8, 1997.

87 KOUSIS, P. C. et al. Photodynamic therapy enhancement of antitumor immunity is regulated by neutrophils. **Cancer Research**, v. 67, n. 21, p. 10501–10510, 2007.

88 NELSON, J. S. et al. Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 80, n. 20, p. 1599–605, 1988.

89 DOUGHERTY, B. W. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

90 KORBELIK, M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 500–508, 2006.

91 POTTER, W. R.; JOFFE, S. N.; PARRISH, J. A. The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photodestruction of sensitizer. **Photochemistry Photobiology**, v. 46, n. 1, p. 97-101, 1987.

92 JACQUES, S. L. Simple optical theory for light dosimetry during PDT. **Proceedings of SPIE**, v. 1645. p. 155–165, 1992.

93 FOSTER, T. H.; GAO, L. Dosimetry in photodynamic therapy: oxygen and the critical importance of capillary density. **Radiation Research**, v. 130, n. 3, p. 379, 1992.

94 BRAICHOTTE, D. R. et al. Optimizing ight dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 340–346, 1996.

95 PANJEHPOUR, M. et al Optimization of light dosimetry for photodynamic therapy of Barrett's esophagus: efficacy vs. incidence of stricture after treatment. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 61,n. 1, p. 13–18, 2005.

96 ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. Prostate PDT dosimetry. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3, n. 4, p. 234–246, 2006.

97 WESTON, M. A.; PATTERSON, M. S. Calculation of singlet oxygen dose using explicit and implicit dose metrics during benzoporphyrin derivative monoacid ring a (bpd-ma)-pdt in vitro and correlation with mll cell survival. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 5, p. 1129–1137, 2011.

98 LOPEZ, N.; MULET, R.; RODRÍGUEZ, R. Tumor reactive ringlet oxygen approach for Monte Carlo modeling of photodynamic therapy dosimetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, v. 160, p. 383–391, 2016.

99 MOESTA, K. T. et al. Lack of reciprocity in drug and light dose dependence of photodynamic therapy of pancreatic adenocarcinoma in vitro lack of reciprocity in drug and light dose dependence of photodynamic therapy of pancreatic adenocarcinoma in vitro1. **Cancer Research**, v. 55, p. 3078-3084,1995.

- 100 WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S.; LILGE, L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm. **Lasers in Medical Science**, v. 12, n. 3, p. 182–199, 1997.
- 101 JARVI, M. T.; PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C. Insights into photodynamic therapy dosimetry: simultaneous singlet oxygen luminescence and photosensitizer photobleaching measurements. **Biophysical Journal**, v. 102, n.3, p. 661–671, 2012.
- 102 BROWN, C. The statistical analysis of dose-effect relationships. In: BUTLER, G. C. **Principles of ecotoxicology**: SCOPE 12. New York: John Wiley, 1978. cap.6.
- 103 GLASBEY, C. A tolerance-distribution-free analyses of quantal dose-response data. **Applied Statistical**, v. 36, n. 3, p. 251–259, 1987.
- 104 ELING, M. Fitting asset returns to skewed distributions: are the skew-normal and skew-student good models? **Insurance: mathematics and economics**, v. 59, n. 2, p. 45–56, 2014.
- 105 ATIF, M. et al. In vitro studies of photofrin® mediated photodynamic therapy on human rhabdomyosarcoma cell line (RD). **Laser Physics Letters**, v. 22, n. 1, p. 286–293, 2012.
- 106 BERLANDA, J. et al. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 100, n. 3, p. 173–180, 2010.
- 107 MOORE, R. B. et al. A comparison of susceptibility to photodynamic treatment between endothelial and tumor cells in vitro and in vivo. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, n. 3, p. 160–169, 2007.
- 108 HENDERSON, B. W. et al. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. **Cancer Research**, v. 45, n. 2, p. 572–6, 1985.
- 109 LUNA, M. C.; CORNER, C. J. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. **Cancer Research**, v.51, n.16, p. 4243–9, 1991.
- 110 DYSART, J. S.; PATTERSON, M. S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. **Physics in Medicine and Biology**, v. 50, n. 11, p. 2597–2616, 2005.
- 111 WESTON, M. A.; PATTERSON, M. S. Simple photodynamic therapy dose models fail to predict the survival of mll cells after hp-ph-pdt in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 3, p. 750–759, 2009.
- 112 ATIF, M. et al. In vitro study of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for apoptosis in human cervical HeLa cell line. **Laser Physics Letters**, v. 6, n. 12, p. 886–891, 2009.
- 113 WILSON, B. C.; OLIVO, M.; SINGH, G. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy.

Photochemistry and Photobiology, v. 65, n. 1, p. 166–176, 1997.

114 CASAS, A. et al. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 2, p. 397–405, 2006.

115 HARTL, B. A. et al. Characterizing low fluence thresholds for in vitro photodynamic therapy. **Biomedical Optics Express**, v. 6, n. 3, p. 770, 2015.

116 GANESAN, S.; MASILAMANI, V. Photodynamic activity on human larynx epidermoid carcinoma cell line, HEp-2. **Medical Oncology**, v. 11, n. 3–4, p. 139–141, 1994.

117 WHITEHURST, C. et al. Performance of a non-laser light source for photodynamic therapy. **Proceedings of SPIE**, v. 2371, p. 482–487, 1994.

118 LING, D. et al. Photodynamic efficacy of photosensitizers under an attenuated light dose via lipid nano-carrier-mediated nuclear targeting. **Biomaterials**, v. 33, n. 21, p. 5478–5486, 2012.

119 ZHOU, Z. et al. Photo-killing mechanism of 2-demethoxy-2,3-ethylenediamino hypocrellin B (ED AHB) to HeLa cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 117, p. 47–54, 2012.

120 WANG, H. et al. Combination of a novel photosensitizer dtpg with 650 nm laser results in efficient apoptosis and cytoskeleton collapse in breast cancer mcf-7 cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 69, n. 3, p. 549–554, 2014.

121 MONTAZERABADI, A. R. et al. The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 109, p. 42–49, 2012. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.004.

122 CRESCENZI, E. et al. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 5, p. 537–544, 2004.

123 TEITEN, M.-H. et al. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 9–14, 2003.

124 DYSART, J. S.; SINGH, G.; PATTERSON, M. S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 196–205, 2005.

125 KIM, J. J.; TANNOCK, I. F. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 7, p. 516–525, 2005.

126 BERENBAUM, M. C.; BONNETT, R.; SCOURIDES, P. In vivo biological activity of the components of haematoporphyrin derivative. **British Journal of Cancer**, v. 45, n. 4, p. 571–581, 1982.

- 127 BOWN, S. G. et al. Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver. **British Journal of Cancer**, v. 54, n. 1, p. 43–52, 1986.
- 128 TRALAU, C. et al. Photodynamic therapy with phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in a transplantable rat fibrosarcoma. **British Journal of Cancer**, v. 55, n. 4, p. 389–395, 1987.
- 129 POTTER, W. R. PDT dosimetry and response. **Proceedings of SPIE: photodynamic therapy: mechanisms**, v. 1065, p. 88–99, 1989.
- 130 PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C.; GRAFF, R. In vivo tests of the concept of Photodynamic Threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, n. 3, p. 343–349, 1990.
- 131 FARRELL, T. J. et al. Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model. **Photochemistry and Photobiology**, v. 68, n. 3, p. 394–399, 1998.
- 132 MENEZES, P. F. C. et al. Correlation of cytotoxicity and depth of necrosis of the photoproducts of photogem®. **Laser Physics**, v. 17, n. 4, p. 461–467, 2007.
- 133 FERREIRA, J. et al. Experimental determination of threshold dose in photodynamic therapy in normal rat liver. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 6, p. 469–475, 2007.
- 134 FERRAZ, R. C. M. C. et al. Determination of threshold dose of photodynamic therapy to measure superficial necrosis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 93–99, 2009.
- 135 MADAN, A. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome p450 expression in cultured human hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 4, p. 421–431, 2003.
- 136 LUCKERT, C. et al. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 393–406, 2016.
- 137 KANEBRATT, K. P.; ANDERSSON, T. B. Evaluation of HepaRG Cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 7, p. 1444–1452, 2008.
- 138 ANTHERIEU, S. et al. Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes p450 in differentiated heparg cells. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 3, p. 516–525, 2010.
- 139 GERETS, H. H. J. et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 69–87, 2012.
- 140 KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, n. 4455, p. 497–499, 1980.

- 141 HART, S. N. et al. A Comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 Cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 6, p. 988–994, 2010.
- 142 CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 4, p. 361–366, 2003.
- 143 SAUNDERS, N. A. et al. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 8, p. 675–684, 2012.
- 144 BERG, K. Resistance mechanisms in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 14, n. 8, p. 1376–1377, 2015.
- 145 ZAMARRÓN, A. et al. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1378–1389, 2015.
- 146 MCDERMOTT, M. et al. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 40, 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00040.
- 147 SINGH, G. et al. Resistance to photodynamic therapy in radiation induced fibrosarcoma-1 and Chinese hamster ovary-multi-drug resistant. cells in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 2, p. 307–312, 1991.
- 148 GILABERTE, Y. et al. Cellular intrinsic factors involved in the resistance of squamous cell carcinoma to photodynamic therapy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 9, p. 2428–2437, 2014.
- 149 WEIJER, R. et al. Low-power photodynamic therapy induces survival signaling in cultured hilar cholangiocarcinoma cells. **BMC Cancer**, v. 31, p. 1–17, 2015. doi: 10.1186/s12885-015-1994-2.
- 150 MAYHEW, S. et al. Investigation of cross-resistance to a range of photosensitizers, hyperthermia and UV light in two radiation-induced fibrosarcoma cell strains resistant to photodynamic therapy in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 1, p. 39, 2001.
- 151 SINGH, G. et al. In Vitro Induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 6, p. 651, 2001.
- 152 TSAI, T. et al. ALA-PDT results in phenotypic changes and decreased cellular invasion in surviving cancer cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 305–315, 2009.
- 153 MILLA, L. N. et al. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2266–2278, 2011.
- 154 KIM, J. et al. Photodynamic therapy (PDT) resistance by PARP1 regulation on PDT-induced apoptosis with autophagy in head and neck cancer cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 9, p. 675–684, 2014.
- 155 MARVIN MINSKY. **Microscopy apparatus**. US 3013467A, 07 Nov. 1957, 19 Dec. 1961.

156 JENKINS, M. C.; EGELHAAF, S. U. Confocal microscopy of colloidal particles: towards reliable, optimum coordinates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 136, n. 1–2, p. 65–92, 2008.

157 LIU, L. et al. Growth inhibition effect of HMME-mediated PDT on hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 5, p. 1715–1722, 2014.

158 SHARKEY; S. M. et al. Mitochondrial alterations in photodynamic therapy-resistant cells. **Cancer Research**, v. 53, n. 20, p. 4994–4999, 1993.

159 LEUNIG, A. et al. Relation of early Photofrin uptake to photodynamically induced phototoxicity and changes of cell volume in different cell lines. **European Journal of Cancer**, v. 30A, n. 1, p. 78–83, 1994.

160 SPECHT, K. G., RODGERS; M. A. Plasma membrane depolarization and calcium influx during cell injury by photodynamic action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1070, n. 1, p. 60–68, 1991.

161 MENEZES, P. F. C. et al. Photodynamic therapy for Photogem® and Photofrin® using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Physics Letters**, v. 4, n. 7, p. 546–551, 2007. doi: 10.1002/lapl.200710023.

162 MELO, C. A. S. et al. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 3, p. 183–188, 2004.

163 CANPOLAT, M.; MOURANT, J. R. Monitoring photosensitizer concentration by use of a fiber-optic probe with a small source–detector separation. **Applied Optics**, v. 39, n. 34, p. 6508, 2000.

164 RAJWA, B. et al. Single-and two-photon spectral imaging of intrinsic fluorescence of transformed human hepatocytes. **Microscopy Research and Technique**, v. 70, n. 10, p. 869–879, 2007.

165 MOSSMAN, B. T. et al. Identification of neoplastic versus normal cells in human cervical cell culture. **Obstetrics and Gynecology**, v. 43, n. 5, p. 635–9, 1974.

166 ANDREONI, A. et al. Effects of laser irradiation on hematoporphyrin-treated normal and transformed thyroid cells in culture. **Cancer Research**, v. 43, n. 5, p. 2076–2080, 1983.

167 PATRICE, T. et al. Experimental aspects of in vitro and in vivo photochemotherapy. **Biochimie**, v. 68, n. 6, p. 923–926, 1986.

168 SPRIK; S. A., SULLIVAN; M. J., CAREY; T. E. In vitro photosensitization of human head and neck squamous cancer cells by dihematoporphyrin-ether. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery** : official journal of american academy of otolaryngology-head and neck surgery, v. 99, n. 1, p. 28–37, 1988.

169 BÖHMER, R. M.; MORSTYN, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature, and cell size. **Cancer Research**, v. 45, n. 11, p. 5328–5334, 1985.